

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際公開

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



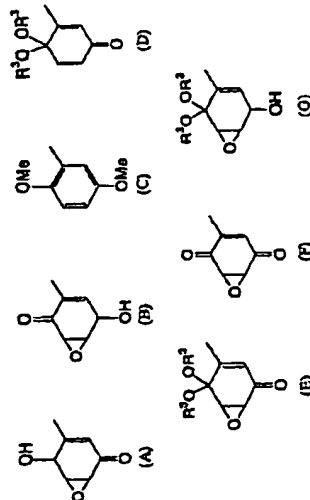
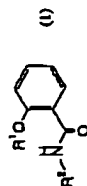
(43) 国際公開日
2004年1月8日 (08.01.2004)

(10) 国際公開番号
WO 2004/002465 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/167, 4500, 31/356, A61P 01/10, 3500, 3504, 4300
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008134
- (22) 国際出願日: 2003年6月26日 (26.06.2003)
- (23) 国際公開の言語: 日本語
- (25) 国際公開の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特許2002-183866 2002年6月26日 (26.06.2002) JP
特許2003-37167 2003年2月14日 (14.02.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶応義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8073 東京都港区三田2丁目1番4号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤 一夫 (梅澤有)
- (11) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (12) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: DRUG COMPOSITION CONTAINING NR-X B INHIBITOR

(54) 発明の名称: NR-X B阻害剤を含む医薬組成物



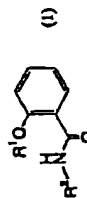
(57) Abstract: A drug composition for ameliorating the symptoms attributed to tumor cells, comprising a compound represented by the general formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient. General formula: (I) wherein R¹ represents hydrogen or a C₁₋₄ alkanyl group; and R² represents a group of any of the following formulae: (A) - (G) in which R³ represents a C₁₋₄ alkyl group.

/ 読者有 /

(57) 要約:

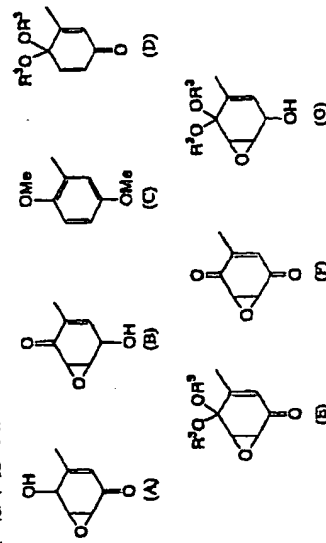
腫瘍細胞に起因する症状を改善するための一般式 (I) で表される化合物またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物である。

一般式 (I)



(式中 R¹ は水素または C₁₋₄ のアルカノイル基であり、

R² は下記式 (A) - (G) のいずれかで表される基である)



(式中 R³ は C₁₋₄ のアルキル基である)

明 細 書

NF- κ B 阻害剤を含む医薬組成物

5 関連文献とのクロスリファレンス

本願は、2002年6月26日に出版した特願2002-185866号、及び2003年2月14日に出版した特願2003-37167号に基づき優先権を主張する。それらの文献をこの明細書中に引用する。

技術分野

本発明は、医薬組成物、腫瘍細胞増殖阻害剤、接着分子発現抑制剤、アポトーシス誘導剤、動脈硬化または癌の予防・治療剤、及び悪疫質治療剤、並びに治療方法に関する。

背景技術

近年、各種腫瘍において NF- κ B の恒常的活性化が相次いで報告されている。例えば、膀胱癌 (Hum. Gene Ther. 10: 37-47, 1999)、乳癌 (Cancer Res. 9: 3810-3818, 2001)、メラノーマ (Cancer Res. 61: 4901-4949, 2001) などの腫瘍で NF- κ B がしばしば活性化されている。このような NF- κ B の活性化はアポトーシス誘導機能を不活性化し、腫瘍の進展を促進している可能性があると考えられている。これは、 κ B を高発現させることで NF- κ B を阻害し、NF- κ B の活性の高い新生細胞特異的に細胞死を誘導できることから示唆される (Hum. Gene Ther. 10: 37-47, 1999)。

また、悪疫質 (cachexia; 悪液質とも表記される。) は、悪性腫瘍、結核、糖尿病、血液疾患、内分泌・代謝疾患などの慢性病において、食欲不振、進行する体重減少、貧血、皮膚乾燥、浮腫などを主症状とする全身不良を呈する疾患である。特に悪性腫瘍

の末期患者などに、よくみられる症状であり、体重の減少・貧血などを中心とした全身機能の低下を示す。癌患者が悪疫質を発症すると、合併症のリスクが高くなり、化学療法に対する反応が悪くなる。さらに、全身の衰弱のため、癌に対する化学療法や放射線治療の副作用も大きくなり、悪疫質のため死に至ることもある。

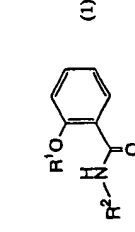
これまで、悪疫質が発症する詳細なメカニズムは、完全には解明されていないが、近年になって、インターロイキン 6 (IL-6) や腫瘍壊死因子 α (TNF- α) など、幾つかのサイトカインの関与を含め、ようやく、そのメカニズムに関する手がかりが得られるようになり、つぎにきた (最新医学 1999 年 54 巻 10 号 2502-2507 頁)。例えば、癌悪疫質における様々な症状の発現機序としては、悪疫質によって発現が誘導され過剰発現したサイトカインが、中枢神経系に作用し、摂食減少、発熱、低血圧、無気力状態などの症状を引き起こし、また糖質、タンパク質、脂質の異化の亢進状態を招くとされる。

このような悪疫質における症状を抑制するのにステロイド投与が有効である。悪疫質患者にステロイドを投与すると、ステロイドの免疫反応抑制作用やそれによる抗炎症作用、さらに悪疫質誘導サイトカインの産生抑制作用により、癌悪疫質の代謝異常が是正され、体重減少、食欲不振、無気力、味覚異常、貧血などの悪疫質症状が軽減、改善される。しかし、ステロイドの長期服用は、その重篤な副作用が大きな問題となる。ステロイドは、本来自己の持つホルモンであるため、摂取したステロイドは過剰なホルモンと同様の作用効果を示し、例えば、腎臓における塩の再吸収に関与することにより、副作用として浮腫や高血圧が現われることがある。

一方、オメガ 3 不飽和脂肪酸が、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制したり、急性期反応蛋白の合成に影響することを利用して、EPA (eicosapentaenoic acid) の投与が悪疫質の

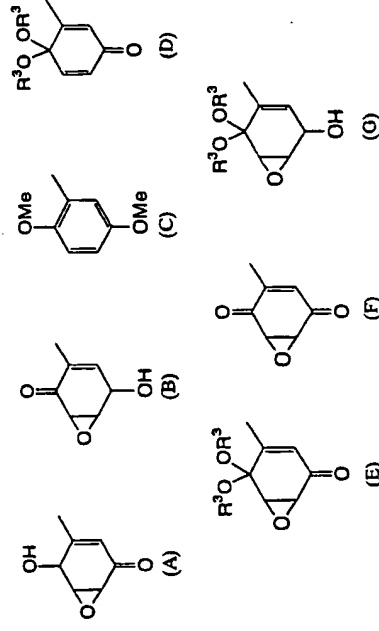
IL-8、TNF- α など) および細胞接着分子 (例えば、ICAM-1、VCAM-1 など) をコードする遺伝子の発現を調節する (Choshi, S. ら, Annu. Rev. Immunol. 16: 225-260 (1998))。このように、TNF- α の機能発現のための細胞内ターゲット分子の一つは NF- κ B であると考えられる。

近年、NF- κ B の活性化阻害作用を有する物質として、下記的一般式 (1) で表される化合物が開発された (国際公開第 WO 01/12588 号パンフレット; Matsumoto ら, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 865 (2000))。



10

(式中、R¹ は水素原子または C 2 ～ 4 のアルカノイル基であり、R² は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。)



(式中、R³ は C 1 ～ 4 のアルキル基である。)

15

改善に一定の効果を上げている。しかし、このような栄養製剤は、作用が間接的であるため、顕著で確実な効果は期待しにくい。

したがって、ステロイドのような広範な作用を有する薬剤とは異なり、悪疫質に特異的で、効果の顕著な薬剤の開発が求められるようになった。このような要請の下、例えば、サリドマイドには TNF- α の阻害効果があるため、悪疫質の症状の改善が期待され、癌悪疫質の治療剤として用いられるようになった。しかし、TNF- α には、血管新生という生体内での別の作用があり、従って、サリドマイドを投与すると、血管新生も阻害されるという副作用が生じる。このように、比較的特異性の高い薬剤であっても、副作用は必ず生じるのであるから、さまざまな状況下での使用を考慮すると、異なる作用機序を有する様々な薬剤の開発が望まれている。

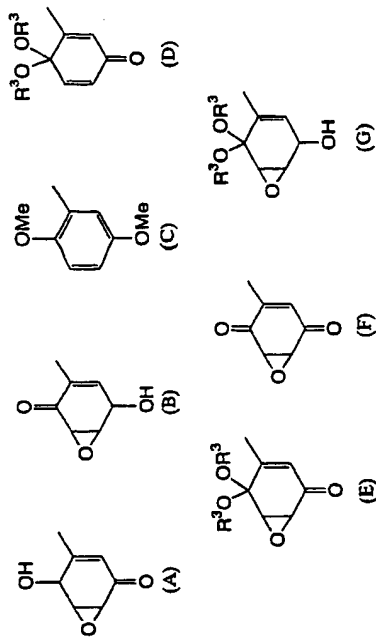
一方、動脈硬化にはコレステロールを減少させて間接的に治療効果のあるメバロチンなどが使われているが効果が不十分である。癌細胞転移阻害剤として臨床使用されているものはまだない。金属プロテアーゼ阻害剤などが開発中であるが全く約束される状況ではない。一般的な抗癌剤は副作用が強く、使用が著しく限定されているのは周知のとおりである。

そこで、本発明は、NF- κ B の活性化を伴う症状を改善することができ、癌組織形成物を提供することを目的としてなされた。

発明の開示

NF- κ B は核内で機能する転写因子であるが、その内因性抑制因子である I κ B の存在下では、それらは複合体を形成し、不活性化として細胞質に存在する。細胞が TNF- α などによる刺激を受けると、I κ B の分解が誘導されて NF- κ B が活性化し、活性化した NF- κ B は、核内に移行して DNA の NF- κ B 結合サイトに結合し、免疫反応や炎症反応に関与するサイトカイン (例えば、IL-1、IL-2、

6



式中、R³はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

また、前記腫瘍細胞のアポトーシスによって、少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよいし、前記腫瘍細胞のアポトーシスが寄与しないで、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。

また、NF-κBの活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。

前記症状は、例えば、腫瘍転移である。また、血管内皮細胞との接着を阻害することにより、腫瘍転移を改善することを特徴としてもよい。

前記腫瘍細胞の増殖を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。

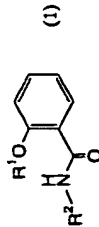
また、前記症状が、例えば、ホジキン病、悪性疫質、白血病からなるグループから選ばれる症状である。前記腫瘍細胞は、例え

6

必要であることから、本発明者らは、接着因子を発現させない薬剤を用いることで問題を解決した。同様に、悪疫質発症のメカニズムにIL-6やTNF-αが関与しているとすると、その細胞内ターゲット分子であるNF-κBの機能阻害は、悪疫質による症状の予防/改善に有効である可能性があると考えた。

そこで、悪疫質の症状を誘発したモデルマウスに上記化合物を投与し、症状を観察したところ、悪疫質の症状の予防/改善に有効であることがわかり、本発明が完成した。本明細書では、症状とは、病気に罹患したことに伴って生じる幅広い現象を指し、必ずしも患者が訴える外見上の異常のみを指すものではない。

すなわち、本発明に係る医薬組成物は、腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善するための下記的一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。



式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

7

ば乳癌細胞などである。

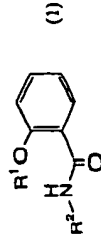
また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。



6 前記癌悪疫質の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つの症状が予防されるか、または改替することを特徴としてもよい。ただし、悪疫質に伴う諸症状は、これらに限らず、皮膚乾燥や浮腫などであっても、本発明の技術的範囲に属する。

10 また、本発明に係る医薬組成物は、前記腫瘍細胞が形成する腫瘍内の血管新生を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改替することを特徴としてもよい。

また、本発明に係る医薬組成物は、NF-κBを活性化させる治療による NF-κB の前記活性化を阻害することにより、前記治療の効果を増大させることができる下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。

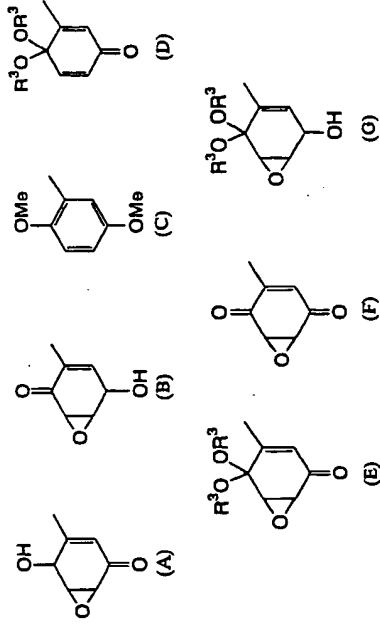


20

式中、R¹は水素原子またはC 2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル

8

基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



6 式中、R³はC 1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

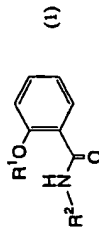
前記 NF-κB を活性化させる治療は、抗腫瘍剤を用いた治療であつてもよいし、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であつてもよい。なお、前記医薬組成物と前記抗腫瘍剤とを有効成分として含有することとしてもよい。前記抗腫瘍剤としては、例えば、カンプテシン、またはダウノルビシンである。

また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。



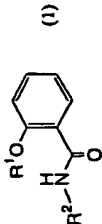


本発明に係る血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制するため
の接着分子発現抑制剤は、下記的一般式(1)で表される化合物ま
たはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するこ
とを特徴とする。

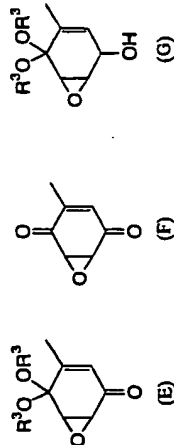
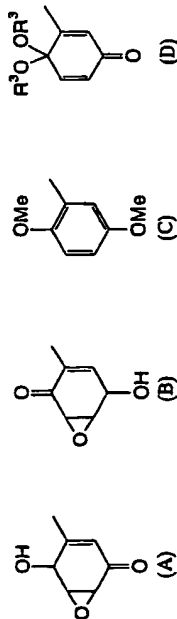


式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、
アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル
基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。
R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

本発明に係る腫瘍細胞の増殖を阻害するための腫瘍細胞増殖
阻害剤は、下記的一般式(1)で表される化合物またはその薬理学
的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。



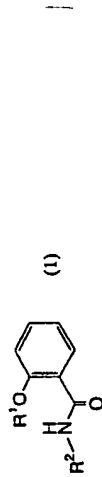
式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、
アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル
基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。
R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



式中、R³はC1～4のアルキル基であり、アルキル基として
は、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの
異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

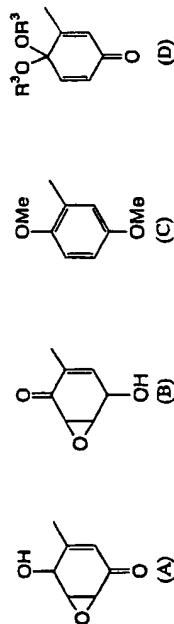
また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴
としてもよい。

12



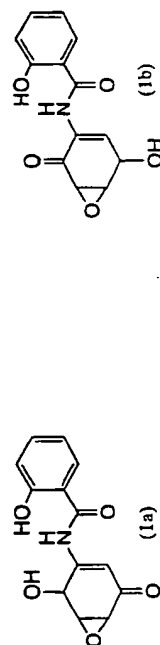
式中、 R^1 は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。

6 R^2 は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。

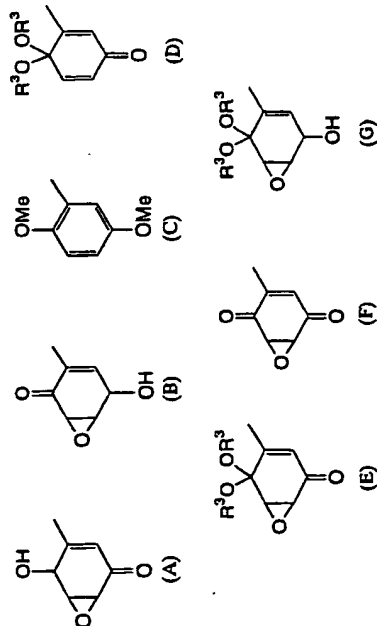


式中、 R^3 はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

10 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とし、



11



式中、 R^3 はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

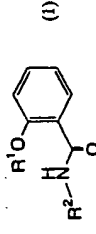
6 また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。



10 本発明に係る腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するためのアポトーシス誘導剤は、下記の一般式(I)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。

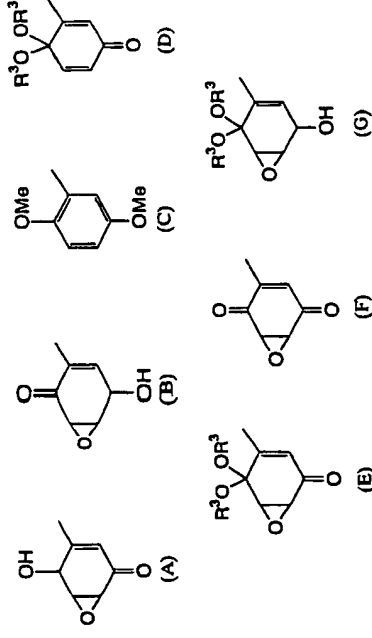
14

作用を有する化合物は下記一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩であつてもよい。



6

式中、 R^1 は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。 R^2 は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



10

式中、 R^3 はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

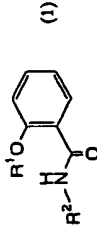
また、前記予防・治療剤は、癌の転移抑制のために用いることとしてもよい。

15

本発明の悪疫質治療剤は、下記一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する

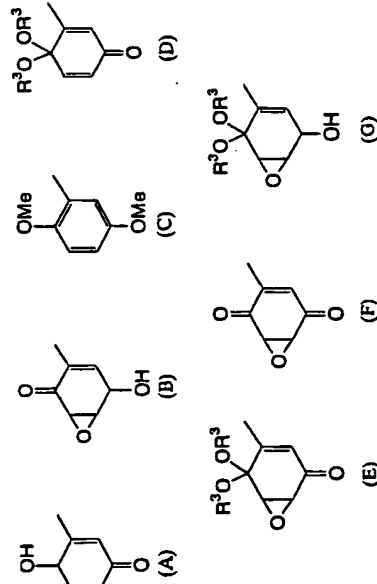
13

本発明の動脈硬化の予防・治療剤は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とする。前記NF- κ B阻害作用を有する化合物は下記一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩であつてもよい。



6

式中、 R^1 は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。 R^2 は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



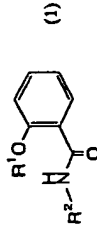
式中、 R^3 はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。

16

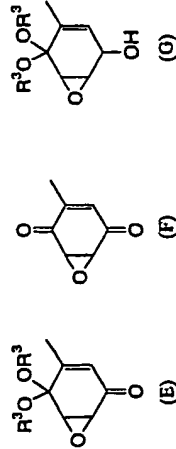
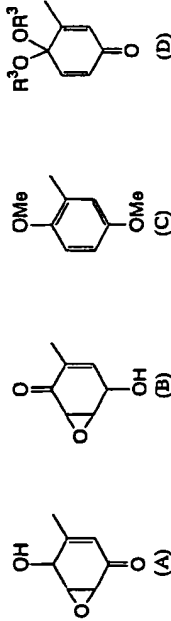
本発明の癌の予防・治療剤は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とする。前記NF- κ B阻害

15

ことを特徴とする。

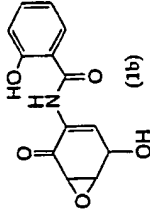
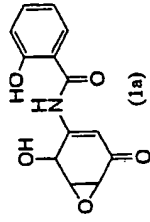


式中、 R^1 は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。 R^2 は、下記の式(A)から(G)のいずれかで置換される基である。



式中、 R^3 はC1～4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてよい。

16

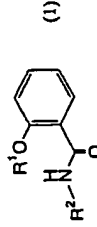


また、これらの化合物が、腫瘍患者（例えば、担癌患者）における癌悪疫質の治療剤であることを特徴としてもよいが、悪疫質を発症している患者であれば、その原因は癌でなくともよい。

また、腫瘍患者（例えば、担癌患者）における癌悪疫質の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つの症状を予防されるか、または改善することを特徴としてもよい。ただし、悪疫質に伴う諸症状は、これらに限らず、皮膚乾燥や浮腫などであっても、本発明の技術的範囲に属する。

さらに、本発明の悪疫質治療剤は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有してもよい。

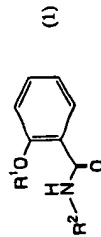
本発明に係る治療方法は、腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善するための下記的一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を用いることを特徴とする。



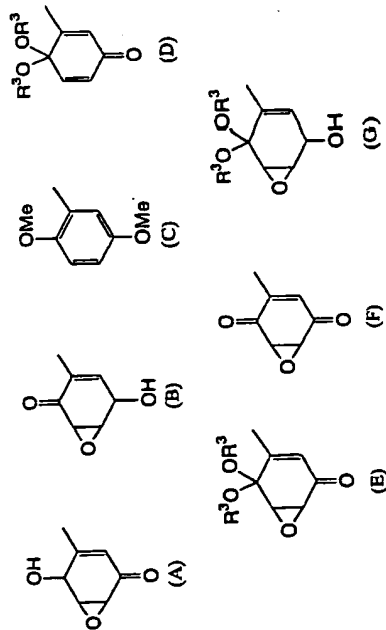
式中、 R^1 は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。 R^2 は、下記の式(A)から(G)のいずれかで置換される基である。



また、本発明に係る治療方法は、血管内皮細胞と白血球との接着を阻害することにより、動脈硬化を改善するための下記的一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を用いることを特徴とする。



式中、 R^1 は水素原子またはC2~4のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。
 R^2 は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。



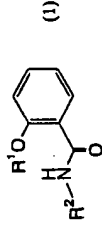
式中、 R^3 はC1~4のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらは、異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。なお、治療方法には、予防方法や進行抑制方法なども含まれる。

前記腫瘍細胞のアポトーシスによって、少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよいし、前記腫瘍細胞のアポトーシスが寄与しないで、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。また、NF- κ Bの活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴としてもよい。

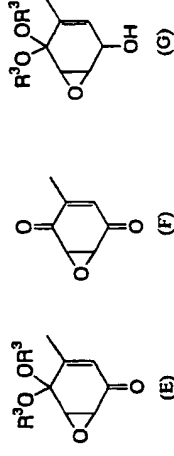
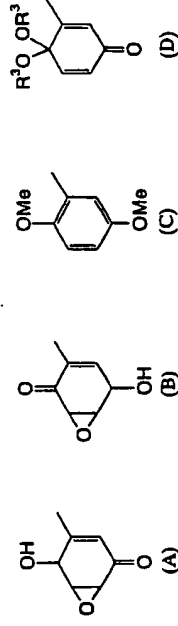
前記症状は、例えば、腫瘍転移、前記腫瘍細胞の増殖から生じる症状、ホジキン病、癌悪疫質からなるグループから選ばれる症状である。

また、前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴としてもよい。

20



式 中、 R^1 は水素原子または C 2 ～ 4 のアルカノイル基であり、アルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、特にアセチル基が好ましい。
 R^2 は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。

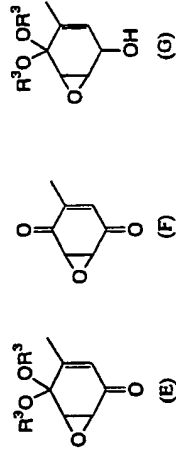
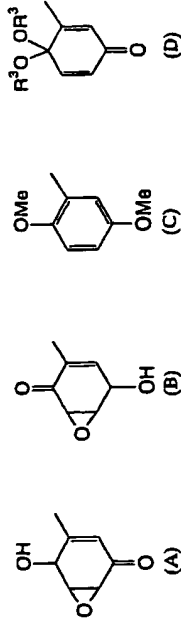


式 中、 R^3 は C 1 ～ 4 のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。なお、治療方法には、予防方法や進行抑制方法なども含まれる。

前記 NF- κ B を活性化させる治療は、抗腫瘍剤の投与であつてもよいし、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であつてもよい。

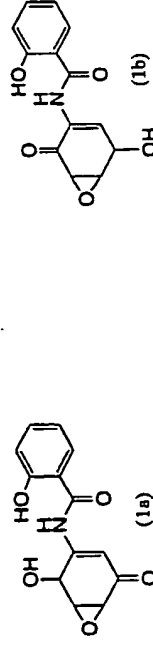
また、前記化合物が下記の式 (1a) または (1b) であることを特徴としてもよい。

19

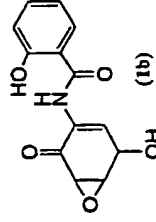
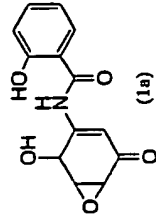


式 中、 R^3 は C 1 ～ 4 のアルキル基であり、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、特にメチル基、エチル基が好ましい。なお、治療方法には、動脈硬化の予防方法や動脈硬化の進行抑制方法なども含まれる。

また、前記化合物が下記の式 (1a) または (1b) であることを特徴としてもよい。



さらに、本発明に係る治療方法は、NF- κ B を活性化させる治療を行うステップと、下記の一般式 (1) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物を投与するステップとを含むことを特徴とする。



図面の簡単な説明

図 1 は、NF- κ B 阻害作用を有する化合物が、動脈硬化および癌の転移を抑制する作用機構を説明する模式図である。

図 2 は、TNF- α で刺激した時の DHMEQ による阻害効果を示す図である。

図 3 は、TNF- α で刺激した時の ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリンの発現を DHMEQ が抑制した効果を示す図である。

図 4 は、DHMEQ が、HUVECs と白血球（上）または HUVECs と HL-60 細胞（下）の接着を抑制した効果を示す図である。

図 5 は、ATL 細胞の構成的 NF- κ B 活性化に対する DHMEQ の阻害作用に関する、ゲルシフトアッセイの解析結果を示す図である。

図 6 は、ATL 細胞の構成的 NF- κ B 活性化に対する DHMEQ の阻害作用に関する、レポーター遺伝子アッセイの解析結果を示す図である。

図 7 は、ATL 細胞の構成的 NF- κ B 活性化に対する DHMEQ の阻害作用に関する、共焦点顕微鏡の解析結果を示す図である。

図 8 は、DHMEQ の ATL 細胞に対する増殖阻害作用の濃度依存性解析結果を示す図である。

図 9 は、DHMEQ の ATL 細胞に対する増殖阻害作用の経時的解析結果を示す図である。

図 10 は、DHMEQ の ATL 患者末梢血細胞に対する増殖阻

害作用の解析結果を示す図である。

図 11 は、DHMEQ の正常末梢血単核球に対する増殖阻害作用の解析結果を示す図である。

図 12 は、DHMEQ の ATL 細胞に対するアポトーシス誘導作用の解析結果を示す図である。

図 13 は、DHMEQ のホジキンリンパ腫細胞に対する増殖阻害作用の解析結果を示す図である。

図 14 は、DHMEQ の多発性骨髄腫細胞に対する増殖阻害作用の解析結果を示す図である。

図 15 は、TNF- α によって誘導される NF- κ B の活性化を DHMEQ が阻害する効果を示す図である。

図 16 は、MCF-7 に対する DHMEQ の増殖抑制効果を示す図である。

図 17 は、SCID マウス移植ヒト乳癌細胞株 MCF-7 に対する DHMEQ の増殖抑制効果を示す図である。

図 18 は、ルイス肺腫瘍と、HT-29 に対する COX-2 阻害剤セレコキシブの増殖抑制効果を示す図である。

図 19 は、本発明の一実施例において、p6kb-Luc を JCA-1 細胞にトランスフェクトし、様々な濃度の DHMEQ を投与した時のルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

図 20 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに DHMEQ を投与した時のマウスの体重の時間的変化を示すグラフである。

図 21 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに DHMEQ を投与した時の腫瘍径より算出した腫瘍重量の時間的変化を示すグラフである。

図 22 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに DHMEQ を投与開始後 26 日目の腫瘍重量を示すグラフである。

図 2 3 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目の精巣周囲の脂肪の重量を示すグラフである。

図 2 4 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目の脾臓筋の重量を示すグラフである。

図 2 5 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目のへマトクリット値を示すグラフである。

図 2 6 は、本発明の一実施例において、JCA-1 細胞を接種した担癌マウスに D H M E Q を投与開始後 26 日目に解剖して測定した各臓器の重量を示す表である。

図 2 7 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による多発性骨髄腫 (MM) 細胞株の構成的 NF- κ B 活性化阻害作用についての結果を示す図である。

図 2 8 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による多発性骨髄腫 (MM) 細胞株の増殖阻害作用についての結果を示す図である。

図 2 9 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による多発性骨髄腫 (MM) 患者細胞の増殖阻害作用についての結果を示す図である。

図 3 0 は、本発明の一実施例において、D H M E Q によるホジキンリンパ腫 (HL) 細胞株の構成的 NF- κ B 活性化阻害作用についての結果を示す図である。

図 3 1 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による抗腫瘍剤作用増強効果についての結果を示す図である。

図 3 2 は、本発明の一実施例において、D H M E Q による抗腫瘍剤作用増強効果が抗腫瘍剤による NF- κ B 活性化の阻害によるものであることを示す図である。

図 3 3 は、本発明の一実施例において、ATL 細胞株を腹腔内に接種した SCID マウスを用い、in vivo で D H M E Q の効果を調べた結果を示す図である。

図 3 4 は、本発明の一実施例において、放射線照射した腫瘍細胞における D H M E Q の آپト-シス増強効果について調べた結果を示す図である。

図 3 5 は、本発明の一実施例において、D H M E Q の in vivo ヒト肺癌に対する腫瘍細胞の増殖抑制効果について調べた結果を示す図である。

図 3 6 は、本発明の一実施例において、D H M E Q の放射線併用におけるヒト肺癌細胞株に対する in vitro 増殖抑制効果について調べた結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の目的、特徴、利点及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであろう。以下に記載される発明の実施の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい形態を示すものであり、例示または説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書に記した記載に基づき、様々な変更並びに修飾ができることは、当業者に明らかである。

本発明に係る医薬組成物は、腫瘍細胞に起因する少なくとも 1 つの症状を改善することが可能である。腫瘍細胞に起因する症状の改善には、腫瘍細胞に آپト-シスを生じさせてもよい。この方法の対象症状としては、例えば、ホジキン病、白血病などを挙げるができるが、これらに限定されるものではない。また、腫瘍細胞に起因する症状の改善には、腫瘍細胞の آپト-シスを増進させることもよく、例えば、腫瘍転移、病悪化などを挙げる

ことができるが、これらに限定されるものではない。ここで、腫瘍細胞のアポトーシスが希与しないとは、本発明に係る医薬組成物を患部に投与しても、その効果はその患部における腫瘍細胞のアポトーシスに依存しないことを意味するが、アポトーシスが依存しない効果とは別に、腫瘍細胞のアポトーシスが生じていてもかまわない。なお、腫瘍とは、広義の癌と同じ意味を有し、例えば、リンパ系悪性腫瘍、乳癌、肺癌、肝癌などを指す。

NF- κ Bの活性化は、アポトーシスの制御、細胞増殖、細胞分化等をはじめとする腫瘍形成の様々な面に関与することが報告されている (Albert S. Baldwin, J. Clin. Invest. 107: 241-246 (2001))。さらに、化学療法又は放射線療法による癌細胞でのNF- κ Bの活性化は、癌治療の効果を減少させることが報告されている (Albert S. Baldwin, 前出)。従って、本発明者らは、上述のように癌においても、抗生物質エボキシクイノマイシンC (opoxyquinomicin C) の構造をもとに、デザインし、合成した上述の一般式(1)で表されるDHMEQが抗癌作用を有すると考えていた。

本発明者らは、DHMEQを用いて、成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)細胞のNF- κ Bの活性化に与える影響を調べたところ、DHMEQは、ATL細胞のNF- κ Bの活性化を阻害することを明らかにした。また、DHMEQを用いて、ATL細胞の増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQは、正常細胞の増殖は阻害しないが、ATL細胞の増殖は阻害することを明らかにした。さらに、ATL細胞のアポトーシスの誘導に与える影響を調べたところ、DHMEQはATL細胞のアポトーシスは誘導するが、正常細胞のアポトーシスは誘導しないことを明らかにした。なお、NF- κ B阻害作用を有する化合物としては、サリチル酸アミド誘導体 (W001/12588 A1)、パネボキシドン (panopoxydone; Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 214-221, 1996)、シクロエボキシ

ドン (cycloepoxydon; J. Antibiot. 51, 455-463, 1998)、SN-50 (J. Biol. Chem. 270, 14255-14258)を挙げることができる。その他のNF- κ B阻害作用を有する化合物の製造方法は、以下の文献に記載されている。パネボキシドンはBiochem. Biophys. Res. Commun. 226, 214-221, 1996に記載され、シクロエボキシドンはJ. Antibiot. 51, 455-463, 1998に、SN50はJ. Biol. Chem. 270, 14255-14258, 1996に記載されている。

また、本発明者らは、DHMEQを用いて、ホジキンリンパ腫細胞の増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQは、NF- κ Bが活性化しているホジキンリンパ腫細胞の増殖は阻害するが、NF- κ Bが活性化していない骨髄球系の白血病細胞の増殖は阻害しないことを明らかにした。また、DHMEQを用いて、多発性骨髄腫細胞の増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQは多発性骨髄腫細胞の増殖も阻害することを明らかにした。

従来の化学療法は細胞に普遍的な増殖機構を広く標的としているため、腫瘍細胞のみならず正常細胞に対する影響も大きく、必ずしも有効な治療手段となっていないかった。しかし、上述の一般式(1)で表されるNF- κ B阻害剤DHMEQは、NF- κ Bが活性化している白血病細胞のアポトーシスを誘導し、同じ濃度でヒト正常白血球のアポトーシスを全く誘導しないという実験結果(図8及び11)から、腫瘍細胞に対する特異性が高いことが明らかになっている。従って、DHMEQは、従来の化学療法より副作用が少なく、悪性腫瘍をはじめとする腫瘍に対して医薬組成物としてより有用である。

また、DHMEQは、腫瘍細胞のアポトーシス誘導剤としても有用である。例えば、本発明に係る医薬組成物は、リンパ系悪性腫瘍細胞の増殖阻害作用及びリンパ系悪性腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用によって、リンパ系悪性腫瘍を予防又は治療することができ、予防又は治療の対象となるリンパ系悪性腫瘍の種類

27

は特に限定されるものではないが、悪性リンパ腫、白血病又は骨髄腫の予防又は治療に好適に使用できる。悪性リンパ腫には、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫等が含まれ、骨髄腫には、多発性骨髄腫等の形質細胞性腫瘍等が含まれ、白血病には、急性リンパ性白血病、成人T細胞白血病リンパ腫、慢性リンパ性白血病等が含まれる。

本発明に係る腫瘍細胞増殖阻害剤は、リンパ系悪性腫瘍細胞の増殖阻害作用によって、リンパ系悪性腫瘍細胞の増殖を抑制することができ、これにより、リンパ系悪性腫瘍を予防又は治療することができ、増殖阻害の対象となるリンパ系悪性腫瘍細胞の種類は特に限定されるものではないが、悪性リンパ腫細胞、白血病細胞又は骨髄腫細胞の増殖阻害に好適に使用できる。悪性リンパ腫、白血病又は骨髄腫には、上記に例示した各種リンパ系悪性腫瘍が含まれる。

本発明に係るアポトーシス誘導剤は、リンパ系悪性腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用によって、リンパ系悪性腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することができ、これにより、リンパ系悪性腫瘍を予防又は治療することができ、アポトーシス誘導の対象となるリンパ系悪性腫瘍細胞の種類は特に限定されるものではないが、悪性リンパ腫細胞、白血病細胞又は骨髄腫細胞のアポトーシス誘導に好適に使用できる。悪性リンパ腫、白血病又は骨髄腫には、上記に例示した各種リンパ系悪性腫瘍が含まれる。

本発明に係る医薬組成物、腫瘍細胞増殖阻害剤、及びアポトーシス誘導剤は、リンパ系悪性腫瘍細胞に対して特異的に作用し、正常細胞に対する悪影響はほとんど示さないもので、リンパ系悪性腫瘍の優れた予防・治療効果が期待できる。

一般式(1)で表される化合物(特に、DHMEQ)およびその薬理学的に許容される塩は癌細胞にも作用するが、癌組織の間質(癌組織の中でも正常細胞による構成される部分)細胞に作用す

28

る。特に、癌組織中の血管内皮細胞において、DHMEQはアポトーシスは起こさないが、接着因子等の発現を抑えて(図5)、癌の進展に抑制効果を与える。

炎症性刺激や物理的刺激などが血管内皮細胞に加わると、接着分子の発現が増強され、白血球が血管内皮細胞表面上に接着し、血管外へ移動する。これは、血管内皮細胞内の転写因子であるNF- κ Bが活性化されることにより、ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチンなどの接着分子の発現を活性化するからである。また、転移能の高い大腸癌でもE-セレクチンのリガンドであるシアリルリヌス-Xが高発現することが報告されており、血管内皮細胞内の転写因子であるNF- κ Bが活性化されると、大腸癌細胞が血管内皮細胞表面上に接着しやすくなり、これにより血管外へ浸出しやすくなり、転移促進に働くことが考えられている。そこで、血管内皮細胞表面上の上記接着分子の発現を抑制することは動脈硬化や腫瘍転移の抑制につながると考えられ、NF- κ B阻害剤は動脈硬化や癌細胞の転移抑制に有用であると考えられる。

そこで、本発明者らは、DHMEQを用いて、DHMEQがヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)の接着分子発現に与える影響を調べた。TNF- α によるNF- κ Bの活性化をゲルシフトアッセイにより評価したところ、IKB- α の分解を抑制することなく、NF- κ Bの活性化を抑制した。また、ウエスタンブロッティング法でTNF- α によって誘導されるICAM-1、VCAM-1、E-セレクチンの発現に与えるDHMEQの影響を調べたところ、これら接着分子の発現を抑制し、実際に白血球とHUVECsの接着、白血球細胞とHUVECsの接着も阻害することを見出した。白血球の血管壁への接着は脂質の蓄積などを介して動脈硬化を誘導する一方、癌細胞の接着は血管からの浸出、転移を引き起こす。そこでこれら接着を阻害することは、前者において抗動脈硬化剤に、後者において癌転移抑制剤につながる。従って、NF- κ B阻害作用を有する上記

化合物は動脈硬化または癌細胞の転移を抑制するのに有用である（図1）。また、後述する実施例により、DHMEQは血管内皮細胞の接着因子の発現抑制剤として有用である。

6 アポトーシス非依存性効果の他の例として、細胞の増殖抑制がある。本発明者らは、DHMEQを用いて、ヒト乳癌細胞に対して *in vitro* および *in vivo* で増殖に与える影響を調べたところ、DHMEQがヒト乳癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。一般式(1)で表される化合物およびその薬理学的に許容される塩は、乳癌細胞の増殖抑制効果を有する。従って、これらの化合物は、乳癌の予防・治療剤として有用である。

10 従来、乳癌の治療は、大別すると、化学療法（抗癌剤を使用する治療法）とホルモン療法の2つの方法が知られている。これらの方法は、ともに癌を縮小させ、また再発を防ぐ効果があることが知られているが、問題点もあった。すなわち、抗癌剤の場合は毒性（副作用）があるという最大の問題があり、薬剤耐性も大きな問題であった。ホルモン療法では、まずホルモン感受性のある癌にしか効かないという問題点がある。ホルモン感受性のある癌は全体の約60%であり、残りの40%の患者は最初からホルモン療法を適用することができない。またホルモン療法も耐性の出現があり、大きな問題となっている。従って、DHMEQは乳癌に対して非常に有用であるといえる。

20 また、本発明者らは、慢性病、特に、悪性腫瘍の末期患者などによくみられる悪液質発症のメカニズムにIL-6やTNF- α が関与しているため、その細胞内ターゲット分子であるNF- κ Bの機能的阻害は、悪液質による症状の予防/改善に有効であると考え、悪液質についてもDHMEQが有用であるかを調べた。すなわち、悪液質の症状を誘発したモデルマウスにDHMEQを投与し、症状を観察したところ、DHMEQが悪液質の症状の予防/改善に有効であることを見出した。これにより、DHMEQは悪液

質にも有用であることが明らかとなった。

また、本発明に係る医薬組成物は、NF- κ Bの活性化を阻害することができ、NF- κ Bの活性化により起こるシクロオキシゲナーゼ2（COX-2）の遺伝子発現を抑制することができると考えられる。また、シクロオキシゲナーゼ2の遺伝子発現を抑制することができ、これにより、プロスタグランジンの合成も抑制され、腫瘍血管の新生を阻害又は抑制することができると考えられる。従って、本発明に係る医薬組成物は、腫瘍内における血管新生を阻害し、腫瘍への酸素や栄養分の供給を阻害することにより抗癌作用を呈する治療薬としても有用であると期待される。

また、本発明者らは、化学療法や放射線療法などのNF- κ Bを活性化させる治療による腫瘍細胞でのNF- κ Bの活性化を阻害することにより、腫瘍治療の効果を増大させることができるのではないかと考え、まず、DHMEQによる抗癌剤作用増強効果を調べた。すなわち、カンブトテシン（CPT）、ダウノマイシン（DNR）などの抗癌剤を用い、DHMEQによる抗癌剤作用増強効果を検討したところ、いずれにおいてもDHMEQは抗癌剤の効果を増強することが見い出された。

また、本発明者らは、各抗癌剤処理によるNF- κ B活性化を調べた。いずれの抗癌剤（カンブトテシン（CPT）、ダウノマイシン（DNR）、エトポシド（ETP））で処理しても処理前のものと比較して、一過的に3から20倍のNF- κ B活性が腫瘍細胞に生じていることを見い出した。これにより、DHMEQによる抗癌剤作用増強効果は抗癌剤によるNF- κ B活性化の阻害によるものであることを明らかにした。

次に、DHMEQによる抗癌剤によるNF- κ B活性化の阻害について調べるために、各抗癌剤（カンブトテシン（CPT）、ダ

ウノマイシン(DNR))にDHMEQを併用して腫瘍細胞を処理した時のNF- κ B活性化を調べたところ、いずれの抗腫瘍剤で処理してもNF- κ B活性化はDHMEQ併用により強く抑制されることを見い出した。

一方、放射線治療は活性酵素を発生させるので正常組織のDNAも傷つけて別の癌を発生させたり、残っている癌細胞を悪化させたりする可能性がある。また、放射線照射による酸化ストレスによって、NF- κ Bの活性化が誘導されると、癌細胞はアポトーシスを起こしにくくなり、放射線治療に抵抗性を示すことが知られている。そこで、本発明者らは、DHMEQと放射線照射とを併用した場合も相乗効果が得られるのではないかと考え、DHMEQの放射線併用における腫瘍細胞に対するin vitro増殖抑制効果について調べた。その結果、放射線照射との併用でDHMEQは相乗的な増殖抑制効果を示すことを見い出した。

このように、本発明に係る医薬組成物は、抗腫瘍剤を用いる治療や腫瘍細胞に対する放射線照射による治療などにより引き起こされるNF- κ Bの活性化の阻害剤としても有用である。また、本発明に係る医薬組成物は、抗ウイルス剤との併用も有用である。なお、抗腫瘍剤を用いる治療としては、NF- κ Bを活性化させる抗腫瘍剤であれば特に限定されるものではないが、例えば、カンパトデシン、ダウノルビシンなどを挙げることができる。

本発明に係る医薬組成物は、腫瘍疾患、アレルギー疾患、免疫疾患、炎症性疾患などの疾患に対して用いられる治療と併用することにより、治療の効果を増大させることができる。本発明の医薬組成物は、NF- κ Bを活性化させる治療と同時に用いてもよいが、NF- κ Bを活性化させる治療の後にNF- κ Bの活性化を阻害するために用いることとしてもよい。また、NF- κ Bの活性化を阻害するために、予め上記疾患を伴うヒト及びヒト以外の哺乳動物に投与することとしてもよい。

一方、現在の抗腫瘍剤治療の一つの大きな問題は癌細胞に薬剤排出を機構とする耐性がしばしば生じることである。正常細胞への作用は一般的には耐性が生じにくいとされている。従って、まずこの点が本発明の腫瘍の予防・治療剤の有利な点である。次に、毒性が低いことが予測されており、化学療法に比較した場合の有利な点である。さらに、作用メカニズムからすると、ホルモン療法が対象としないホルモン非感受性の腫瘍も治療の対象になる。この点はホルモン療法と比べ大きな利点になる。以上より、毒性が少ないこと、ホルモン療法と対象が重ならないこと、血管内皮細胞等に耐性が生じにくいことは、臨床上大きな利点となる。また、これらの点は、既存の薬剤との幅広い併用や癌予防への応用の可能性を示唆するものでもある。

以上のことから、本発明に係る医薬組成物は、腫瘍細胞増殖阻害剤、接着分子発現抑制剤、アポトーシス誘導剤、動脈硬化または癌の予防・治療剤、リンパ系悪性腫瘍の予防・治療剤、乳癌の予防・治療剤、悪疫質治療剤などに有用であるといえる。

従って、本発明に係る一般式(1)で表される化合物を有効成分として含有する医薬組成物は、腫瘍、悪疫質、動脈硬化などの治療(予防や進行抑制剤などを含む)に有用である。

以下、本発明の化合物の製造方法、使用形態、使用例(実施例)について、詳細に記述する。

== 本発明の化合物の製造方法 ==

一般式(1)で表される化合物は、Wipfらの合成法(Synthesis, 12号, 1549~1561頁, 1995年)に準じて製造することができる。

以下に、一般式(1)で表される化合物の製造方法の一例を下記の反応工程式に基づいて説明する。

リチロイルアミド-2-シクロヘキセノン化合物を溶剤（塩化メ
チレンなど）に溶解させ、氷冷下で無機酸または有機酸（三フッ
化ホウ素ジエチルエーテル錯体など）を加え、攪拌しながら反応
させる。反応液に溶剤（酢酸エチルなど）を加え、水で洗浄し、
5 酢酸エチル層を濃縮した後、得られた残渣をメタノールで洗浄し
て式（6）で示される5, 6-エポキシ-2-サリチロイルアミ
ド-2-シクロヘキセノン-1, 4-ジオンが得られる。

10 工程g: 5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-3-サリチロイル
アミド-2-シクロヘキセノン（1a, DHM2EQ）の調製
式（5）で示される5, 6-エポキシ-2-サリチロイルアミ
ド-2-シクロヘキセノン-1, 4-ジオンを、溶媒（メタノール、
エタノール、THFなど）に懸濁し、-78〜50℃、好ましく
は氷冷下で、還元剤（水素化ホウ素ナトリウムなど）を加えて反
15 応させる。反応液に溶剤（酢酸エチル、塩化メチレンなど）を加
え、塩酸、水で順次洗浄し、溶剤層を乾燥後、減圧濃縮して、メ
タノールで懸濁、攪拌、洗浄して、式（1a）で示される5, 6-エ
ポキシ-4-ヒドロキシ-3-サリチロイルアミド-2-シク
ロヘキセノン（DHM2EQ）が得られる。

20 工程f: 3, 3-ジアールコキシ-4, 5-エポキシ-6-ヒドロ
キシ-2-サリチロイルアミドシクロヘキセノンの調製
式（4）の5, 6-エポキシ-4, 4-ジアールコキシ-3-サ
リチロイルアミド-2-シクロヘキセノン化合物をメタノール
などの溶剤と重曹水混合格媒に溶解し、-78〜50℃、好まし
くは氷冷下で、還元剤（水素化ホウ素ナトリウムなど）を加え、
25 攪拌しながら反応させる。反応液に溶剤（酢酸エチルなど）を加
え、塩酸、水で順次洗浄し、溶剤層を乾燥後、減圧濃縮、真空乾
燥し、カラムクロマトグラフィーなどで精製して、式（6）で示
される3, 3-ジアールコキシ-4, 5-エポキシ-6-ヒドロキ
シー-2-サリチロイルアミドシクロヘキセンを得る。

工程g: 5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-2-サリチロイル
アミド-2-シクロヘキセノン（1b, DHM3EQ）の調製
式（6）で示される3, 3-ジアールコキシ-4, 5-エポキシ
-6-ヒドロキシ-2-サリチロイルアミドシクロヘキセンを
5 溶剤（アセトンなど）に溶解させ、p-トルエンスルホン酸を加
え、室温で攪拌しながら反応させる。反応液に溶剤（酢酸エチル
など）を加え、水で洗浄し、溶剤層を乾燥し、減圧濃縮して、精
製して、式（1b）の5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-2-サ
リチロイルアミド-2-シクロヘキセノン（DHM3EQ）を得
10 ることができる。

一般式（1）で表される化合物は、弱酸性物質であり、それら
の塩としては第4級アンモニウム塩などの有機塩基の塩、あるいは
は各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との
塩があり、これらの塩の形で利用できる。これらの塩は、公知
15 の方法で製造することができる。

==本発明の化合物の使用形態==

一般式（1）で表される化合物またはその薬理学的に許容される
塩は、単独で使用してもよいし、あるいは他の薬剤（例えば、他
の抗癌剤、ホルモン療法剤）と組み合わせて使用してもよい。

20 一般式（1）で表される化合物またはその薬理学的に許容される
塩をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約1〜100
mg/kg（体重）、好ましくは4〜12 mg/kg（体重）の投与量で、1
回または数回に分けて経口投与または静注してもよいが、その投
与量や投与回数は、疾患の種類、症状、年齢、体重、治療期間、
25 治療効果、投与方法などにより適宜変更しうる。

一般式（1）で表される化合物またはその薬理学的に許容される
塩は、薬理上許容される担体と配合し、乳剤、錠剤、カプセル剤、
顆粒剤、散剤、シロップ剤などの製剤にして経口投与してもよい
し、注射剤などの製剤にして皮下、筋肉内、腹腔内や静脈内へ注

射する、あるいは、坐薬（座剤）などの製剤にして直腸内投与する、あるいは、噴霧剤などの製剤にして口腔または気道粘膜へ噴霧する、あるいは、軟膏やテープ剤などの製剤にして患部（例えば、皮膚や粘膜など）に塗布又は貼付するような態様で非経口投与することができる。

乳剤やシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、オリーブ油、大豆油等の油類、 p -ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として使用して製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として使用して製造できる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液またはこれらの混合物を担体として使用して製造できる。座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等を担体として使用して製造できる。噴霧剤は、例えば、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体として、乳糖、グリセリン等を使用して製造でき、エアロゾル、ドライパウダー等に製剤化できる。

薬理上許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が1種又は2種以上用いられ、製剤化されていてもよい。具体的には、水、薬理上許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサ

ンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリアルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等を挙げることができる。

製剤化に際して使用される添加物としては、例えば、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などを、用いてもよい。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、充填剤、増量剤、付着剤、表面活性剤、安定化剤、殺菌剤、キレート剤、 pH 調整剤、界面活性剤などの製剤添加物を用いることもできる。これらの添加物は製剤の投与単位形態等に応じて適宜選択される。なお、これらの添加物のうち、通常の製剤に使用される成分、例えば、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、 pH 調整剤、界面活性剤等が好ましく選択される。

添加剤の具体例を以下に例示する。

安定化剤：ヒト血清アルブミン；グリシン、システイン、グルタミン酸等のアミノ酸；グルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類及びそれらの誘導体等の糖類；メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース誘導体等。

界面活性剤：ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタ

ンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等の界面活性剤。

緩衝剤：ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 γ -アミノノカプロン酸、グルタミン酸およびそれらの塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）。

5 等電化剤：塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等。

キレート剤：エデト酸ナトリウム、クエン酸等。

10 製剤中の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩（有効成分）の含有率は、1～90重量%の間で変動させることができる。例えば、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの形態をとる場合には、有効成分を5～80重量%含有させるのが好ましい。シロップ剤などの液剤の場合には、有効成分を1～90重量%含有させるのが好ましい。さらに、非経口投与する注射剤の場合には、有効成分を1～10重量%含有させるのが好ましい。

15 一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩の製剤化は、賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトールなどの糖類、バレイシヨ、コムギ、トウモロコシなどのデンプン、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機物、結晶セルロースなど）、結合剤（デンプンのり液、アラビ

20 アゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴール、シリコーン油）、崩壊剤（デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、CMC・Na、CMC・Ca、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなど）、矯味矯臭剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、芳香性精油など）、溶剤

（注射用水、滅菌精製水、ゴマ油、ダイズ油、トウモロコシ油、オリブ油、綿実油など）、安定剤（窒素、二酸化炭素などの不活性ガス、EDTA、チオグリコール酸などのキレート剤、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、 γ -アスコルビン酸、ロシガリットなどの還元物質など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル、クロブタノール、ベンジルアルコール、フェノール、塩化ベンゼンコニウムなど）、界面活性剤（水素添加ヒマシ油、ポリソルベート80、20など）、緩衝剤（クエン酸、酢酸、リン酸のナトリウム塩、ホウ酸など）、希釈剤などを用いて、公知の方法で行われる。

10 以下、本発明にかかる実施例を詳細に説明する。以下の記載では、特に説明がない場合、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

20 なお、以下の実施例で用いた式(1a)で表される化合物(DHMEQ)は、W001/12588 A1の実施例1～5に記載の方法により製造した。以下、式(1a)で表される化合物を「DHMEQ」と呼び、式(1b)で表される化合物を「DHME3EQ」と呼ぶ場合がある。

<実施例1>

ゲルシフトアッセイ (Gel shift assay; Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)) により NF- κ B の活性化を調べた

ところ、DHMEQはHUVECs(慶應病院にて調剤より調製した)においてTNF- α (Techne)、IL-1 β (PEPRO TECH EC LTD)、LPS (Sigma)によるNF- κ Bの活性化を3 μ g/mlで完全に抑制した。図2にはHUVECsをTNF- α で刺激した時のDHMEQによるNF- κ B活性化に対する阻害効果を示す。実験方法は以下のとおりである。

HUVECsを以下のようにしてDHMEQで前処理した。すなわち、メタノールで希釈したDHMEQを、HUVECsを培養している培養液の中にデータに示す濃度になるよう、培養液量の1%量を添加し37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ で2時間インキュベートした。

DHMEQを2時間前処理したHUVECsと無処理のHUVECsをそれぞれ10ng/ml TNF- α 、10ng/ml IL-1 β 、10 μ g/ml LPSで刺激し(すなわち、それぞれの培養液中に添加し、データに示す時間(0、5、10、30分等)、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ でインキュベートした。)、細胞をサンプリングした。集めた細胞を400 μ lのbuffer A (10mM HEPES (Sigma) : pH7.9、1.5mM DTT (Merck)、0.1mM PMSF (Sigma))で懸濁し、15分間静置した後15000 \times gで5分間遠心し、上清を除去した。再度400 μ lのbuffer Aを加え、15000 \times gで5分間遠心し、上清を除去した。次に、40 μ lのbuffer C (20mM HEPES : pH7.9、25% グリセロール(関東化学)、420mM NaCl(関東化学)、1.5mM MgCl $_2$ (関東化学)、0.2mM DTT、0.2mM PMSF)を加え、指でタッピングして細胞を懸濁し、20分間静置した後、15000 \times gで5分間遠心かけ上清を回収し、これを核抽出物とした。4 μ lの下記の合成オリゴヌクレオチド(Promega)、2 μ lの[γ - 32 P]-ATP (Amersham)、2 μ lの10 \times T4PNK buffer (0.5M Tris-HCl(Sigma): pH7.6、0.1mM MgCl $_2$ 、50mM DTT、1mM spermidine, HCl(Sigma)、1mM EDTA(関東化学))を加え、蒸留水で全量18 μ lとした。さらに10units/ μ lのT4 polynucleotide kinase(Takara)を2 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。反応後、TE buffer (10mM Tris-HCl :

pH7.5、1mM EDTA)を80 μ l加え反応を止めた。これをNick column(Amersham)で精製し、 32 PでラベルされたNF- κ Bプロンプを得た。

合成オリゴヌクレオチド:

5' -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (配列番号1)
3' -TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5' (配列番号2)

次に、5 \times binding buffer (375mM NaCl, 75mM Tris-HCl : pH7.0、7.5mM EDTA、7.5mM DTT、37.5% グリセロール、1.5% NP-40(ナカライテスク)、0.5 μ g/ml BSA(Sigma))を4 μ l、1 μ g/ μ lに調整したpoly dI-dC (Amersham)を1 μ l、5 μ g分の核抽出物を加え全量が17 μ lになるように蒸留水を加えた。スーパーシフト用のサンプルにはさらに抗p65抗体(Santa Cruz)を0.5 μ g分添加した。これに 32 PでラベルされたNF- κ Bプロンプを3 μ l加え、25 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その後1時間あらかじめ電流を流しておいた4% ポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel) (6.7mM アクリルアミド (acrylamide; 30/2; 和光)、1.25mM 10 \times TBE buffer(0.9M Tris-boric acid(関東化学) : pH8.3、20mM EDTA)、42ml H $_2$ O、500 μ l APS(ammonium peroxodisulfate; 関東化学)、50 μ l TEMED(関東化学))のウェルにこの20 μ lのサンプルをアプライシ、150Vで泳動した。泳動後、ゲルをろ紙に移し、ゲルドライヤーを用いて乾燥させ、それをフィルムに感光させた。

<実施例2>

ウエスタンブロットティング (Western blotting) 法により、TNF- α で刺激した時のICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリン (E-selectin)の発現にDHMEQが与える影響を調べたところ、TNF- α 単独のときICAM-1、VCAM-1の発現は刺激後9時間でピークを迎え、E-セレクトリンの発現は刺激後6時間でピークを迎えるが、図3に示すようにDHMEQを2時間前処理したHUVECsではそれら接着分子のいずれの発現も顕著に抑制された。実験方法

は以下のとおりである。

DHMEQを2時間前処理したHUVECsと無処理のHUVECsをそれぞれ10ng/ml TNF- α で刺激し、細胞をサンプリングした。これにlysis buffer(20mM Tris-HCl: pH8.0, 150mM NaCl, 2mM EDTA,

6 100mM NaF(関東化学)、400 μ M Na₂VO₄(関東化学)、1% NP-40、1 μ g/ml ロイペプチン(Leupeptin; (財)微生物化学研究所)、1 μ g/ml アンチパイン(antipain; (財)微生物化学研究所)、1mM PMSF)を加え、氷上で5分ごとに撹拌しながら30分間可溶化し、その後15000 \times gで10分間遠心にかけ上清を回収した。この上清

10 のタンパク質濃度をクマシーブリアントブルー液(Bio-Rad)で定量化し、濃度を調整したあと3 \times SDS loading buffer (150mM Tris-HCl: pH6.8, 30% グリセロール、3% SDS(関東化学)、0.03mg/ml ブロモフェノール・ブルー(bromophenol blue)、150 μ l/ml 2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol; 関東化学))を、加えたlysis bufferの半分量加え、5分間煮沸した。こ

15 れをサンブルとし、12.5% ポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel)を用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル内のタンパク質をPVDF膜(Amersham)にトランスファーし、5% スキムミルク(skim milk; 雪印)を含むTBS buffer (20mM Tris-HCl: pH7.6, 137mM NaCl)でブロッキングを行った。その後、ICAM-1(Santa Cruz)、VCAM-1(Santa Cruz)、E-セレクチン

20 (Santa Cruz) それぞれの抗体を用いてPVDF膜と抗体反応をさせ、さらにそれぞれに適した2次抗体(ICAM-1、VCAM-1、及びE-セレクチンの2次抗体(Amersham及びSanta Cruz))と反応させた。そして、ECL法により発色させ、フィルムに感光させた。

25 <実施例3>
図4に示すように白血球(実験者の血液より調製)、HL-60細胞(細胞バンクより購入)共にTNF- α 刺激し、3、6、9時間後の細胞接着数は時間依存的に増加したが、DHMEQを3 μ g/ml処理

するとその接着は顕著に抑制された。この濃度のDHMEQはHUVECsに対して、毒性も増殖抑制も示さなかった。実験方法は以下のとおりである。

24 ウェルプレートにHUVECsをまき、コンフルエント6 (confluent)に培養した。培地の組成は、9.8g/l 培地199(ニッスイより供与)、1.8g/l NaHCO₃(Wako)、10ml/l 1M HEPES buffer(Sigma)、30mg/l ECGS(Becton Dickinson)、6ml/l ヘパリンナトリウム注射液(武田薬品)、10% heat-inactivated FBS(JRH)である。その後、以下の実験を行った。DHMEQを2時間前処理したHUVECsと無処理のHUVECsをそれぞれ10ng/ml TNF- α で刺激し、刺激後0、3、6、9時間の白血球およびヒト急性前骨髄球性白血病株HL-60細胞のHUVECsに対する接着を評価した。今回、比重遠心分離法により分離した単核球を白血球として用いた。

15 TNF- α で刺激後、ウエルをHBSS+ (ニッスイより供与)で2回洗い、500 μ lの培地(培地の組成: 9.8g/l 培地199(ニッスイより供与)、1.8g/l NaHCO₃(Wako)、10ml/l 1M HEPES buffer(Sigma)、30mg/l ECGS(Becton Dickinson)、6ml/l ヘパリンナトリウム注射液(武田薬品)、10% heat-inactivated FBS(JRH))で培地交換を行い、白血球は2.5 \times 10⁶ cells/ウエル、HL-60細胞は7 \times 10⁴ cells/ウエルになるようにウエルに入れた。5% CO₂、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、その後HBSS+で3回穏やかに洗い、その状態を写真にとってHUVECsに接着している細胞数を数えた。

25 以上のように毒性、増殖抑制を示さずNF- κ Bの活性化を抑制し、HUVECsと白血球および白血病細胞の接着を抑制したという点で、このDHMEQは実験や臨床での長期使用が可能であり、有用であると考えられる。

<実施例4>

成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)細胞の構成的

46

(constitutive)NF- κ B 活性化に対する D H M 2 E Q の阻害作用

(1) ゲルシフトアッセイ

細胞の核内に存在する転写因子がプロモーターの特定の塩基配列を持つ領域と結合するかどうかを以下の方法によって検討した。

2 \times 10⁶個の ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) とコントロール細胞株 (K562, Jurkat+TNF) とを 10 μ g/ml の D H M 2 E Q で 12 時間処理し、各細胞株から核抽出液を調製した。また、D H M 2 E Q で処理しない各細胞株からも同様に核抽出液を調製した。なお、細胞株 MT-1 及び TL-0ml は、HTLV-1 でトランスフォームした細胞株で、これらの細胞株では NF- κ B が活性化している。細胞株 K562 (骨髄球系の白血病細胞株) は構成的 NF- κ B を認めない細胞株であり (陰性コントロール)、Jurkat+TNF は、TNF 処理した Jurkat 細胞株である (陽性コントロール)。

15 NF- κ B コンセンサスオリゴマー (Promega) を [γ -³²P]-ATP とガリヌクレオチドキナーゼ (PNK) を用いて末端ラベルして ³²P 標識 NF- κ B プロローブを作製した。

核抽出液のタンパク量 2 μ g 相当と、10,000cpm 相当の NF- κ B プロローブとを 20 μ l のポリュームで混合し、室温で 30 分間反応させた。反応後の溶液を 7.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲルを乾燥後、X 線フィルムに感光させた。

結果を図 5 に示す。なお、図中、左から 6 レーンにおいて、「-」は D H M 2 E Q 未処理の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。右端 2 レーンの陽性コントロールにおける「-」と「+」は、「comp」と右に表示されているように、非標識プロローブによる競合阻害 (「+」は競合分子存在下での実験) の結果を示し、シグナルが NF- κ B 結合配列に特異的であることを示す。

図 5 に示すように、D H M 2 E Q 処理によって ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) における NF- κ B のシグナルがほぼ消失した。一方、K562

46

では、NF- κ B の活性化が観察されていない。

(2) レポーター遺伝子アッセイ (Reporter gene assay ; Luciferase assay)

5 NF- κ B の転写活性を検討するため、NF- κ B 結合配列を 6 コピ一くり返して持つ人工的なプロモーターでドライブされるルシフェラーゼコンストラクト (6kB-Luc plasmid) をレポーターとして用い、このプラスミド DNA を ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) 及びコントロール細胞株 (K562) に一過性に導入した (2 \times 10⁶個細胞/トランスフェクションのスケールで、DMRIE-C (INVITROGEN) を用いてトランスフェクションした)。12 時間後より、5 μ g/ml の D H M 2 E Q で処理し、48 時間後に細胞を回収して、NF- κ B の転写活性をルシフェラーゼの酵素活性として評価した。また、D H M 2 E Q で処理しない各細胞株においても同様の評価を行った。なお、全ての実験は 3 回行い平均値と標準偏差を算出した。

16 結果を図 6 に示す。なお、図中、「-」は D H M 2 E Q 未処理の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。

図 6 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) では、ルシフェラーゼ活性が D H M 2 E Q 処理によって約 50% に抑制され、D H M 2 E Q による ATL 細胞株の NF- κ B 転写活性抑制効果が認められた。一方、ネガティブコントロール細胞株 (K562) ではルシフェラーゼ活性が認められなかった。

(3) 共焦点顕微鏡による解析

D H M 2 E Q は NF- κ B のサブユニット p65 の核移行を阻害すると考えられる。そこで、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) を 10 μ g/ml の D H M 2 E Q で 24 時間処理し、蛍光標識した抗 p65 抗体を用いて、p65 の分布を共焦点顕微鏡により検討した。また、D H M 2 E Q で処理しない各細胞株についても同様の検討を行った。

結果を図 7 に示す。なお、図中、「-」は D H M 2 E Q 未処理の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。

図 7 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では、核が黒く抜けており、DHM2EQ 処理によって p65 の核移行が阻害されていることが示された。

5 構成的 NF- κ B 活性化を阻害することが確認された。

<実施例 5>

DHM2EQ の ATL 細胞に対する増殖阻害作用

(1) DHM2EQ の増殖阻害作用の濃度依存性解析

96 ウェルのプレートに、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) 及びコントロール細胞株 (K562) の各細胞を 1×10^5 個/ウェル播き、DHM2EQ を目的の最終濃度 (2, 5, 10 μ g/ml) になるように添加した。溶媒である DMSO のみを等量加えたもの (0 μ g/ml) をコントロールとして用いた。72 時間培養後、MTT アッセイ法により、細胞の生存率を判定した。相対 MTT 値 (Relative MTT value) は、DHM2EQ 未処理細胞の MTT 値に対する DHM2EQ 処理細胞の MTT 値の比、すなわち (DHM2EQ 処理細胞の MTT 値 / DHM2EQ 未処理細胞の MTT 値) $\times 100$ (%) として求めた。

結果を図 8 に示す。なお、図中、□は K562、▲は TL-0m1、■は MT-1 の結果を示す。

20 図 8 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では DHM2EQ 添加濃度に比例して細胞増殖が阻害されるのに対し、コントロール細胞株 (K562) では細胞増殖がほとんど阻害されなかった。

(2) DHM2EQ の増殖阻害作用の経時的解析

ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) 及びコントロール細胞株 (K562) に対して DHM2EQ を最終濃度が 10 μ g/ml になるように添加して、12, 24, 48, 72 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。溶媒である DMSO のみを等量加えたものをコントロールとして用いた。相対 MTT 値 (Relative MTT value) は上記 (1) と同様にして求めた。

結果を図 9 に示す。なお、図中、□は K562、▲は TL-0m1、■は MT-1 の結果を示す。

図 9 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0m1) では DHM2EQ 処理時間に比例して細胞増殖が阻害されるのに対し、コントロール細胞株 (K562) では細胞増殖がほとんど阻害されなかった。

(3) DHM2EQ の ATL 患者末梢血細胞に対する増殖阻害作用
ATL 患者末梢血より単核球を分離し、ATL 細胞を分離した。患者 3 症例について、分離した ATL 細胞に対し DHM2EQ を最終濃度が 10 μ g/ml となるように添加して、24 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。溶媒である DMSO のみを等量加えたものをコントロールとして用い、DHM2EQ 未処理細胞の MTT 値に対する DHM2EQ 処理細胞の MTT 値の比、すなわち (DHM2EQ 処理細胞の MTT 値 / DHM2EQ 未処理細胞の MTT 値) によって、増殖阻害作用を評価した。

結果を図 10 に示す。

図 10 に示すように、DHM2EQ は、いずれの ATL 患者から得られた ATL 細胞に対しても増殖阻害作用を示すことが確認された。

(4) DHM2EQ の正常末梢血単核球に対する増殖阻害作用
正常末梢血より単核球を分離し、DHM2EQ を最終濃度が 2, 5, 10 μ g/ml となるように添加して、72 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。溶媒である DMSO のみを等量加えたもの (0 μ g/ml) をコントロールとして用いた。細胞の生存率 (Cell Viability) は、コントロール (DHM2EQ 未処理) の MTT 値を 100% としてそれとの比で表した。

結果を図 11 に示す。

図 11 に示すように、DHM2EQ は、正常末梢血単核球に対してほとんど増殖阻害作用を示さなかった。

上記 (1) ~ (4) の結果から、DHM2EQ は、ATL 細胞の

増殖は阻害するが、正常細胞の増殖は阻害しないことが確認された。

<実施例 6 >

D H M 2 E Q の ATL 細胞に対するアポトーシス誘導作用

6 ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) 及びコントロール細胞株 (K562) に対して D H M 2 E Q を最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ になるように添加して 72 時間培養を行った後、ヘキスト染色して核の濃縮あるいは断片化を蛍光顕微鏡で観察することによりアポトーシスの検討を行った。また、溶媒である DMSO のみを等容量加えたものについても同様の検討を行った。

結果を図 1 2 に示す。なお、図中、「-」は D H M 2 E Q 未処理 (DMSO のみ) の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。

10 図 1 2 に示すように、ATL 細胞株 (MT-1, TL-0ml) では D H M 2 E Q 処理によりアポトーシスが誘導され、核の断片化が観察されたのに対し、D H M 2 E Q 未処理細胞及びコントロール細胞株 (K562) ではアポトーシスは観察されなかった。

16 この結果から、ATL 細胞のアポトーシスは誘導しないことが確認されるが、正常細胞のアポトーシスは誘導しないことが確認された。

20 <実施例 7 >

D H M 2 E Q のホジキンリンパ腫細胞に対する増殖阻害作用

D H M 2 E Q のホジキンリンパ腫細胞に対する増殖阻害作用の経時的解析及び濃度依存性解析を、実施例 2 と同様に行なった。ホジキンリンパ腫細胞としては、ホジキンリンパ腫細胞株 KMII-2 及び L-540 を用いた。

26 結果を図 1 3 に示す。なお、図中、■は K562、○は KMII-2、●は L-540 の結果を示す。

図 1 3 示すように、ホジキンリンパ腫細胞株 (KMII-2, L-540) では D H M 2 E Q 添加濃度に比例して細胞増殖が阻害されるのに

対し、コントロール細胞株 (K562) では細胞増殖がほとんど阻害されなかった。また、ホジキンリンパ腫細胞株 (KMII-2, L-540) では D H M 2 E Q 処理時間に比例して細胞増殖が阻害されるのに対し、コントロール細胞株 (K562) では時間が経っても細胞増殖がほ

5 ほとんど阻害されなかった。

これらの結果から、D H M 2 E Q は、NF- κ B が構成的に活性化しているホジキンリンパ腫細胞の増殖は阻害するが、NF- κ B 活性化のないコントロール細胞の増殖は阻害しないことが確認された。

10 <実施例 8 >

D H M 2 E Q の多発性骨髄腫細胞に対する増殖阻害作用

D H M 2 E Q の多発性骨髄腫細胞に対する増殖阻害作用の濃度依存性解析を、実施例 2 と同様に行なった。多発性骨髄腫細胞としては、多発性骨髄腫細胞株 196T1B を用いた。

15 結果を図 1 4 に示す。なお、図中、「-」は D H M 2 E Q 未処理の結果、「+」は D H M 2 E Q 処理の結果を示す。

図 1 4 に示すように、多発性骨髄腫細胞株 (196T1B) では D H M 2 E Q 添加濃度に比例して細胞増殖が阻害された。

20 この結果から、D H M 2 E Q は、多発性骨髄腫細胞の増殖を阻害することが確認された。

<実施例 9 >

MCF-7 細胞における NF- κ B と DNA の結合を D H M 2 E Q が阻害する効果

1. 方法

25 1-1 核抽出物の調製

MCF-7 細胞 (オックスフォード大学 Adrian L. Harris 教授より分与) を 1×10^6 細胞/ml で 4ml ずつ 60mm dish に 1 つの条件につき 2 枚ずつまいた。翌日、60mm dish 中の培地を 2ml に合わせて、1、3、 $10 \mu\text{g/ml}$ に調製した D H M 2 E Q を 2 時間処理後、 20ng/ml

の TNF- α で処理した。TNF- α 処理 30 分後に 60mm dish 中の培地をサッカー (sucker) で抜き、細胞を外用 PBS-で 2 回洗浄し cold PBS⁻を 1ml 入れ、ラバーポリスマンを用いて細胞をはがし(2回)、15ml 遠心チューブに入れ、2 枚の 60mm dish から 15ml 遠心チューブに細胞を集め、1,000rpm で 5 分間遠心にかけ、上清を除去した。これに cold PBS⁻を 700 μ l 入れ、細胞をピッペッティングしてから 1.5ml エッペンドルフチューブに集め (2 回)、3,500rpm で 5 分間遠心にかけ、上清を除去した。以下の操作は氷中で行った。buffer A (10mM HEPES: pH 7.9, 1.5mM DTT, 0.2mM PMSF) 400 μ l に懸濁し、ボルテックスで撹拌した後 15 分間静置し、13,000rpm で 5 分間遠心にかけ上清を除去した。また buffer A を 400 μ l ずつ加え、13,000 rpm で 5 分間遠心にかけ上清を除去した。次に、集めた核を 40 μ l の buffer C (20mM HEPES-KOH: pH7.9, 25% グリセロール, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF) に懸濁させ、20 分間静置した後、13,000rpm で 5 分間遠心にかけ、上清をエッペンに回収し、核抽出物とした。

1-2 プロローブの調製

4 μ l の 1.75pmol/ μ l oligonucleotide (Promega: Madison, MA)、2 μ l の 10 \times T4 PNK buffer (500mM Tris-HCl: pH8.0, 100mM MgCl₂, 50mM DTT)、及び 10 μ l の蒸留水を混ぜ、さらに、2 μ l の [γ -³²P]-ATP、2 μ l の T4 PNK を加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベート後、80 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl: pH8.0, 1mM EDTA) を加えて反応を停止させた。

次に、Nick column をスタンドに取り付け、カラムの下に廃液びんを置き、上下のキャップをはずして、カラムに充填してある TE buffer を廃液びんに回収した。3ml 程度の蒸留水を壁を伝わらせてカラムに加え、廃液びんに回収した。ここで、100 μ l のラベル化した DNA 溶液を、壁に伝わらないようにしてカラムにのせた。下に 1.5ml エッペンドルフチューブを準備して 400 μ l の蒸

留水をカラムに加え、出てきた溶液をエッペンドルフチューブに回収した (fraction 1)。下に新しいエッペンドルフチューブを準備し、さらに 400 μ l の蒸留水をカラムにのせ、出てきた溶液をエッペンドルフチューブに回収した (fraction 2=labeled oligonucleotide)。滴定が終わったらキャップを閉め、ガイガーカウンタでカラムと fraction 1, fraction 2 それぞれ測定し、fraction 2 > カラム > fraction 1 となることを確認した。

使用の際は精製した標識された DNA プロローブを約 3 \times 10⁴cpm/ μ l に蒸留水で希釈した。

10 DNA プロローブの塩基配列は以下の通りである。

5'-ATGTCAGGGGACTTCCAGGC-3' (配列番号 3, J. Biol. Chem. 277, 24625-24630, 2002)

1-3 結合反応 (binding reaction) およびゲル (gel) 電気泳動

5 \times binding buffer (375mM NaCl, 75mM Tris-HCl: pH7.0, 7.5mM EDTA, 7.5mM DTT, 37.5% グリセロール, 1.5% NP-40, 1.25mg/ml BSA) を 4 μ l, 1 μ g/ml poly dI-dC (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) を 1 μ l, 核抽出物をタンパク量 5 μ g 分に、全量が 17 μ l になるように水をくわえた。これに 3 μ l の DNA プロローブを加え、混和してから 25 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。その後、20 μ l の反応液を 4% ポリアクリルアミドゲルのウェルに移し、0.25 \times TBE buffer を用いて、150V で泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、フィルムに感光させた。

2. 結果

DHMEQ を処理していないコントロール細胞では TNF- α 処理 30 分後に NF- κ B と DNA の結合を示すバンドが観察されたが、DHMEQ で処理した細胞では、NF- κ B と DNA の結合は濃度依存的に阻害され、10 μ g/ml の濃度で NF- κ B と DNA の結合は完全に阻害された (図 15)。

したがって、DHMEQ は TNF- α によって誘導される NF- κ B

の活性化を阻害するということが示された。

<実施例 10>

DHMEQ のヒト乳癌細胞に対する in vitro 抗腫瘍効果

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 (NF- κ B 非恒常的活性化腫瘍) を DHMEQ ; 10, 50 μ g/ml 下に 24, 48, 72 時間培養し、増殖抑制効果を検討したところ、コントロールに比較して 10 μ g/ml では 24 時間で 39%, 48 時間で 25%, 72 時間で 17% の細胞が生じ、50 μ g/ml では 24 時間以降生存細胞は認められなかった (図 16)。

濃度及び時間に依存的に細胞増殖が抑制された。

以上の実験結果からは、DHMEQ は時間依存的に癌細胞増殖を抑制するが、短時間では比較的高濃度でもアポトーシスの誘導効果は少なく、抗癌剤とは異なる機構を有していることがわかる。これは、DHMEQ を生体内で副作用の少ない薬剤として用いることができることを示唆している。

実験方法の詳細は以下のとおりである。

MCF-7 を 6 穴プレートに 1×10^4 /ウェルで播き、翌日 DHMEQ ; 10, 50 μ g/ml の培地 (5ml) と各々の濃度の DHMEQ と等量の DMSO (DHMEQ の溶解に使用) のみのコントロール培地 (5ml) に上清を変えた。各々の群は 3 ウェルずつで行った。ここを 0 時間とし、24, 48, 72 時間培養した後トリプシン (trypsin) + EDTA で細胞を剥がし、トリパンブルー (trypan blue) で細胞数を計測して、平均値と標準偏差を算出した。各々、DMSO のみのコントロール細胞との比較で、データを出し、プロットした。

<実施例 11>

DHMEQ のヒト乳癌細胞に対する in vivo 抗腫瘍効果

SCID マウス (日本クレア) 皮下腫瘍モデルに 4mg/kg の DHMEQ を週 3 日投与し、随時的に腫瘍体積を測定して、腫瘍増殖抑制効果を検討した。また、マウスの体重も同時に測定した。その結果、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 17)。マウスの

死亡、体重減少は見られなかった。

実験方法の詳細は以下のとおりである。

6 週令の SCID マウス背部皮下に PBS 100 μ l に浮遊させた 1×10^6 の MCF-7 を接種した。DHMEQ は 0.5% メチルセルロース液 (メチルセルロース : ナカライデスク) に 200 μ l で 4mg/kg となるよう懸濁した。薬剤含有液もしくは 0.5% メチルセルロース液を MCF-7 接種翌日より週 3 回、200 μ l を腹腔内投与した (各群 8 匹)。腫瘍の長径および短径を 7 日おきにノギスで測定し、(長径) \times (短径) $\div 2$ で腫瘍体積を算出した。同時に体重も測定した。

既存の乳癌治療薬の動物実験における腫瘍増殖抑制効果については、いわゆる抗癌剤では、多くのデータがある。しかし、本薬剤の有効性を類似の機構を有する薬剤と比較する場合、近年その腫瘍増殖抑制における有効性が明らかとなっている抗癌剤の COX-2 阻害剤が妥当である。COX-2 阻害剤では、MCF-7 に対する有効性の報告はみられないが、他の MCF-7 同様に頻用される癌細胞の増殖抑制効果 (図 18 : ルイス肺 (Lewis lung) 腫瘍と、HT-29 に対する COX-2 阻害剤セレコキシブ (celecoxib ; Pharmacia) の有効性を示す) と比較すると少なくとも同等以上の効果がある」と結論できる。実験方法は以下の通りである (Cancer Res., 60, 1306-1311, March 1, 2000.)。ルイス肺腫瘍 10^6 個を C57/B16 マウスの後肢に接種し、接種日からセレコキシブ (G. D. Searle/Monsanto Co. 提供) をおのおの 160, 480, 1600, 3200ppm で混合した餌を与えた群 (n=20/group) の腫瘍体積を plethysmometer を用いて週 2 回測定した。HT-29 ヒト大腸癌細胞株 10^6 個をヌードマウスの後肢に接種し、腫瘍体積が 100mm³ に達した時点から 160ppm で経口投与し、週 1 回測定した。データは mean \pm SD。

以上のことから、DHMEQ はアポトーシス非依存性の強い抗腫瘍効果を有することがわかった。また、その低副作用性が示唆

された。従って、DHMEQは、乳癌の原発巣の増殖抑制、原発巣から他の組織への癌の転移に効果があるのみならず、予後の乳癌の転移を抑制したり、乳癌を予防するのに有効であることもわかった。

6 現在、乳癌の予防薬として唯一使用されているのは抗エストロゲン剤タモキシフェン (tamoxifen; AstraZeneca) である (北米で認められている。わが国ではその有用性が確認されておらず、使用は認められていない)。タモキシフェンの作用機序はエストロゲン受容体に結合し、女性ホルモンエストロゲンの結合を拮抗阻害することにある。従って、タモキシフェンによる発癌予防効果はホルモン感受性の乳癌のみに限られる。ホルモン非感受性の乳癌における発癌は予防できない。また、タモキシフェンには子宮体癌を発生させる副作用がある。ホルモン療法剤以外に乳癌発癌抑制作用を示すものはまだない。本薬剤は従来の強い細胞障害性を有する薬剤とは異なる機序を有する。従って、将来的にがん予防に使用される可能性がある。さらに本薬剤によるNF- κ Bの非活性化はNF- κ B同様に炎症の中心的なメチエーターであるCOX-2の産生もそのカスケードの上流において阻害する。

まとめ：

- 20 1) 本発明の薬剤は毒性が極めて低いことより、抗癌剤などとは全く異なる利点を有する。
- 2) ホルモン感受性癌のみを対象とするホルモン療法ともそのスベクトラムにおいて大きく異なる。以上より、臨床的に考慮し、極めて新規性が高い。
- 25 3) 加えて、最近注目を集める乳癌の化学予防の観点から、新規メカニズムを有する薬剤として有望である。

<実施例 1 2 >

毒性試験

DHMEQの急性毒性試験は以下のように行った。DHMEQ

を10% DMSO saline + Tween80 1滴に溶解し、ICRマウスの腹腔に投与し、24時間後マウスの生死、状態を観べた。その結果、0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5mg/マウスでは生存、5mg/マウスでは即日死亡した。即日死亡マウスは解剖所見の結果、臓器の沈着、腹水少量であった。5mg/マウスは約250mg/kgにあたる。急性毒性LD50は187.5mg/kgと算出した。

<実施例 1 3 >

一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩の悪疫質に対する効果を検定するため、悪疫質を誘発したBALB/cヌードマウスをヒト悪疫質患者のモデルマウスとして用いた。この際、悪疫質症状の誘発には、アンドロゲン非感受性とト前立腺癌細胞株JCA-1を用いた。

DHMEQによるNF- κ B活性の阻害効果を測定するため、NF- κ Bの転写活性を指標に、様々な濃度のDHMEQに対するNF- κ B活性を測定した。レポーターには、NF- κ B結合配列を6コピー繰り返して有するプロモーターの下流に、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして有するベクターコンストラクト (p6kb-Luc) を用いた。このレポーターベクターミッドを、GenePOSTER (商標: Gene Therapy Systems) を用いて、JCA-1細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの14時間後に、細胞培地に2.5, 5, 10, 20, 40 μ g/mlのDHMEQを添加し、さらに8時間培養して、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールとして、何も処理を行わないものと、DHMEQを含有しない溶媒 (ここではDMSO) のみで処理したものをとり、同時に実験を行った。それぞれのルシフェラーゼ活性を測定し、その絶対値をそれぞれの殺細胞率で標準化して表した。なお、全ての実験は独立に3回行い、平均値と標準偏差を算出した。

結果を図19に示す。

図19に明らかなように、細胞内のNF- κ B活性は、投与した

DHMEQ濃度が高くなるほど、阻害効果が有意に大きくなった。このことから、DHMEQは、JCA-1細胞のNF- κ B活性を、濃度依存的に阻害することが明らかとなった。

＜実施例14＞

6 悪疫質の症状に対するDHMEQの効果測定するため、上記ヌードマウスを用いて、悪疫質モデルマウスを作製した。6週令のヌードマウス側腹皮下に、PBS 100 μ lに懸濁した1 \times 10⁷個のJCA-1細胞を接種した（以下、担癌マウスと呼ぶ）。接種されたマウスは、接種14日後、触診できる位に腫瘍が増大した時点で、ランダムに3つのグループに分け、グループ2（Gr2；13匹）では8mg/kg体重のDHMEQを毎日投与し、グループ3（Gr3；13匹）にはDMSOを毎日投与し、グループ4（Gr4；11匹）には何も投与しなかった。なお、JCA-1細胞を接種していない正常ヌードマウスをグループ1（Gr1；14匹）とした（以下、正常マウスと呼ぶ）。DHMEQを投与した翌日より、1日おきに、体重（図20）と腫瘍径より算出した腫瘍重量（図21）を測定した。DHMEQ投与開始後26日目に、全てのマウスを解剖し、腫瘍の重量（図22）、精巣周囲の脂肪の重量（図23）、腓腹筋の重量（図24）、ヘマトクリット値（図25；血中細胞成分の全血液量に対する容積の割合。血液を遠心することによって測定できる。）を測定し、グループごとに測定値を集計した。

25 実験結果を以下に述べる。まず、8mg/kg体重のDHMEQ投与群（Gr2）は、非投与群（Gr3、Gr4）に対し、有意に体重の減少が抑制された（図20）。しかし、上記の濃度のDHMEQでは、腫瘍の退縮効果は観察されなかった（図21、図22）。実験終了時（DHMEQ投与開始後26日目）における測定では、精巣周囲の脂肪の重量（図23）や腓腹筋の重量（図24）は、DHMEQ投与群（Gr2）において、非投与群（Gr3、Gr4）に対し、有意に重量の減少が抑制された。また、ヘマトクリット値では、

DHMEQ投与群（Gr2）において、非投与群（Gr3、Gr4）に対し、有意に回復傾向にあった。実験終了時に各群に各臓器の重量を測定し、比較検討したが、DHMEQの投与による各臓器への好ましくない影響は認められなかった（図26）。

5 以上より、JCA-1細胞の接種によって癌を生じ、悪疫質症状を引き起こしたマウスに対し、DHMEQを投与することにより、生じた癌の大きさや重量に影響を与えない濃度であっても、悪疫質症状の緩和や抑制が観察された。

＜実施例15＞

10 DHMEQによる多発性骨髄腫(MM)細胞株の構成的NF- κ B活性化阻害作用

2 \times 10⁶個のMM細胞株KMM1、RPM18226、U266を10 μ g/mlのDHMEQで12時間処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例4の（1）と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、DHMEQのNF- κ B阻害作用を検討した。この結果、MM細胞株においてDHMEQ処理によりNF- κ Bによるシグナルが消失することが明らかとなった（図27のA）。なお、TNF処理したJurkat(Jurkat+TNF)は陽性コントロールとして用いた。図中の「comp」は非標識プローブによる競合阻害実験の結果で、シグナルがNF- κ B結合配列に特異的であることを示す。

20 次に、MM細胞株KMM1、RPM18226、U266を10 μ g/mlのDHMEQで処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例4の（1）と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、時間経過によるNF- κ B阻害作用を検討した。その結果を図27のBに示す。これにより、DHMEQ処理後1時間ではほぼNF- κ Bの活性化は阻害され、16時間の時点においてもNF- κ Bの活性化阻害が持続されるのが確認できた。

次にNF- κ Bの活性化阻害効果をレポーターアッセイを用いて調べた。まず、6kB-Luc plasmid DNAをMM細胞株KMM1、RPM18226、

U266 にトランスフェクションにより導入した (2×10^5 個細胞/トランスフェクションのスケールで、DMRIE-C (INVITROGEN) を用いてトランスフェクトした)。12 時間後より $5 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 12 時間処理を行い、DHMEQ による NF- κ B の転写抑制効果を検討した。その結果を図 27 の C に示す。これにより、DHMEQ で処理した WT-1 及び TL-0ml は、未処理のものに比べて NF- κ B の転写が約 50% 抑制されることが明らかとなった。従って、DHMEQ による NF- κ B の転写抑制効果が示された。

<実施例 16>

10 DHMEQ による多発性骨髄腫 (MM) 細胞株の増殖阻害作用

細胞増殖阻害に対する DHMEQ の濃度の影響を調べるため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 を用いて実施例 5 の (1) と同様の方法により、細胞の生存率を判定した。その結果を図 28 の A に示す。なお、図中の横軸は DHMEQ の濃度を示し、縦軸は DHMEQ 未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち (DHMEQ 処理 / 未処理) $\times 100\%$ を示す。図 28 の A に示すように、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 は DHMEQ の濃度に比例して細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。

次に、DHMEQ の増殖抑制の時間経過による影響を調べるため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 を用いて、実施例 5 の (2) と同様の方法により、時間経過に対する増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。その結果を図 28 の B に示す。なお、図中の横軸は DHMEQ の濃度を示し、縦軸は DHMEQ 未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち (DHMEQ / 未処理) $\times 100\%$ を示す。図 28 の B に示されるように、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 は DHMEQ の処理時間に比例して細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。

また、DHMEQ による MM 細胞株へのアポトーシスの誘導について調べるため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 に対し、10

$\mu\text{g/ml}$ の濃度で 0、24、48 時間培養を行い、アネキシン V 染色によりアポトーシスの検討を行った。その結果を図 28 の C に示す。これにより、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 は DHMEQ 処理によりアネキシン V 陽性細胞が生じ、アポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。

また、DHMEQ による MM 細胞株のアポトーシスの誘導を確認するため、MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 に対し、 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 72 時間培養を行い、ヘキスト染色して核の濃縮あるいは断片化を蛍光顕微鏡で観察することによりアポトーシスの検討を行った。その結果を図 28 の D に示す。MM 細胞株 KMM1、RPMI8226、U266 においては、DHMEQ 処理により核の断片化した像が観察された。以上の結果から、DHMEQ は、ATL 細胞のアポトーシスを誘導することを確認した。

<実施例 17>

15 DHMEQ による多発性骨髄腫 (MM) 患者細胞の増殖阻害作用

次に、DHMEQ の多発性骨髄腫 (MM) 患者細胞の増殖阻害作用を調べるため、MM 細胞 (MM1, MM2, MM3) を患者骨髄より分離し、DHMEQ $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 48 時間培養を行い、増殖阻害作用を MTT アッセイ法により検討した。その結果を図 29 の A に示す。なお、コントロールとして正常末梢血より分離した単核球 (PBMC) を用いた。図中の縦軸は DHMEQ 未処理細胞に対する処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち (DHMEQ 処理 / 未処理) $\times 100\%$ を示す。図 29 の A に示されるように、多発性骨髄腫 (MM) 患者からの MM 細胞は DHMEQ の濃度に比例して増殖が抑制されたのに対し、正常末梢血より分離した単核球への影響はほとんど認められなかった。

このことから、DHMEQ は、MM 患者の MM 細胞に対しては増殖阻害活性をもつが、正常単核球に対してはほとんど作用せず、副作用の少ない医薬組成物として機能しうることが明らかとな

った。

また、DHMEQによる多発性骨髄腫(MM)患者細胞へのアポトーシスの誘導について調べるため、多発性骨髄腫(MM)患者細胞に対し、DHMEQ 10 μ g/mlの濃度で72時間培養を行い、ヘキスト染色して核の濃縮あるいは断片化を蛍光顕微鏡で観察することによりアポトーシスの検討を行った。その結果を図29のBに示す。図29のBに示されるように、多発性骨髄腫(MM)患者からのMM細胞はDHMEQ処理によりアポトーシスが誘導され、核が断片化することを確認した。

10 <実施例18>

DHMEQによるホジキンリンパ腫(HL)細胞株の構成的NF- κ B活性化阻害作用

2 \times 10⁶個のHL細胞株KMH2、L428、L540、HDLM2およびコントロール細胞株K562を10 μ g/mlのDHMEQで12時間処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例4の(1)と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、NF- κ B阻害作用を検討した。その結果、HL細胞株ではDHMEQによりNF- κ Bのシグナルがほぼ消失することが明らかとなった(図30のA)。なお、細胞株K562(骨髄球系の白血病細胞株)はNF- κ Bの構成的活性化を認めない細胞株であり、ネガティブコントロールとして用いた。一方、TNF処理したJurkat(Jurkat+TNF)はポジティブコントロールとして用いた。図中の「comp」は非標識プロローブによる競合阻害実験で、シグナルがNF- κ B結合配列に特異的であることを示す。

25 次に、HL細胞株KMH2、L540を10 μ g/mlのDHMEQで処理し、各細胞株から核抽出液を調製し、実施例4の(1)と同様の方法によりゲルシフトアッセイを行い、時間経過によるNF- κ B阻害作用を検討した。その結果、処理後1時間ではほぼNF- κ Bの活性化は阻害され、16時間の時点においてもNF- κ Bの活性化阻害が

持続されるのが確認できた(図30のB)。

NF- κ Bは、p50、p65、c-Relの各構成因子からなる複合体である。そこで、HL細胞株KMH2、L428、L-540、HDLM2において構成的に活性化されているNF- κ Bの構成因子について検討を行った。実施例1に記載の方法と同様にNF- κ Bのp50、p65、c-Relに対する抗体を用い、スーパースhiftを行った。その結果を図30のCに示す。図30のCに示すように、特にp50に対してスーパースhiftが観察され、HL細胞株のいずれにおいてもp50が複合体中に存在することが確認できた。

10 L428及びKMH2においては、DHMEQ処理後も弱いシグナルが残存する。そこで、これらのシグナルがDHMEQ抵抗性のNF- κ Bの特異的な構成因子を有しているかどうか調べた。また、HL細胞株KMH2、L428L-540、HDLM2を5 μ g/mlのDHMEQで12時間処理し、残存するNF- κ Bの成分をNF- κ Bのp50、p65、c-Relに対する抗体を用いて、実施例1に記載の方法と同様にスーパースhiftを行った。その結果を図30のDに示す。図30のDに示すように、残存する成分は主にp50で図30のCと同様の結果が得られ、DHMEQに対して抵抗性を示す特有の構成因子はないと考えられた。

20 <実施例19>

DHMEQによる抗腫瘍剤作用増強効果

カンブトデシン(CPT)、ダウノマイシン(DNR)、エトポシド(ETP)を抗腫瘍剤として用い、DHMEQによる抗腫瘍剤作用増強効果を検討した。抗腫瘍剤作用およびその増強効果は実施例5の(2)に記載のMTTアッセイ法により検討した。その結果を図31に示す。なお、本実施例において、細胞はKMH2を用いた。図中の横軸は各抗腫瘍剤の濃度およびDHMEQ濃度を示す。各々抗腫瘍剤の濃度を3段階とし、それぞれについてDHMEQのみ、抗腫瘍剤のみ、両者併用で検討した。DHMEQは10 μ g/mlの濃度で

使用し、処理時間は 48 時間とした。縦軸は未処理細胞に対する
処理細胞の MTT 値の相対値、すなわち(処理/未処理)×100%を
示す。図 3 1 の A は抗腫瘍剤としてカンプトテシン(CPT)を、B
は抗癌剤としてダウノマイシン(DNR)を、C は抗腫瘍剤としてエ
トポシド(ETP)を用いた。この結果、いずれにおいても D H M E
Q は抗腫瘍剤の効果を増強することが示された。

<実施例 2 0 >

D H M E Q による抗腫瘍剤作用増強効果は抗腫瘍剤による NF- κ
B 活性化の阻害による

各抗腫瘍剤処理による NF- κ B 活性化を調べるために、各抗腫
瘍剤(カンプトテシン(CPT)、ダウノマイシン(DNR)、エトポシ
ド(ETP))で腫瘍細胞を処理した時の NF- κ B 活性化を実施例 4 の
(1)に記載のゲルシフトアッセイにより調べた。その結果を図
3 2 の A に示す。なお、本実施例において、細胞は KMH2 を用い
た。図中の各パネル下段は得られたシグナルを定量化し、処理前
を 1 とした時の相対値を示す。図 3 2 の A に示されるように、い
ずれの抗腫瘍剤で処理しても処理前のものと比較して、一過的に
3 から 20 倍の NF- κ B 活性が腫瘍細胞に生じていることが示され
た。

腫瘍細胞において、カンプトテシン(CPT)及びダウノマイシン
(DNR)により誘導された NF- κ B の構成因子を調べるため、実施例
1 に記載の方法と同様に NF- κ B の p50、p65、c-Rel に対する抗
体を用い、スーパースhiftを行った。その結果を図 3 2 の B に示
す。図 3 2 の B に示すように、カンプトテシン(CPT)又はダウノ
マイシン(DNR)で処理した腫瘍細胞において活性化 NF- κ B は主
p50 を含んでいることが明らかとなった。

次に、D H M E Q による抗腫瘍剤による NF- κ B 活性化の阻害
について調べるために、各抗腫瘍剤(カンプトテシン(CPT)、ダ
ウノマイシン(DNR))に D H M E Q を併用して腫瘍細胞を処理し

た時の NF- κ B 誘導を実施例 4 の(1)に記載のゲルシフトアッ
セイを行い、時間経過による NF- κ B 阻害作用を検討した。その
結果を図 3 2 の C に示す。なお、本実施例において、細胞は KMH2
を用いた。図中の各パネル下段は得られたシグナルを定量化し、
処理前を 1 とした時の相対値を示す。図 3 2 の C に示されるよう
に、いずれの抗腫瘍剤で処理しても NF- κ B 誘導は D H M E Q 併
用により強く抑制された。

<実施例 2 1 >

ATL 細胞株を腹腔内に接種した SCID マウスを用い、in vivo で
の D H M E Q の効果を調べた。まず、SCID(Male C.B17-scid/scid
scid/scid)マウス(CB17 系統、5 週齢、雄; SLC Japan, Inc
(Shizuoka, Japan))を 1mg の IL-2 レセプター抗体(TM- β 1; J.
Immunol. 147: 2222-2228, 1991)で 3~5 日間処理し、 3.4×10^7
の ATL 細胞株 MT-2 を腹腔内に接種した。その後、それらのマウ
スに 0.5% CMC(carboxymethyl cellulose; Sigma)液に溶解した
D H M E Q 4mg/kg-体重又は 12mg/kg-体重を 1 ヶ月にわたり週 3
回腹腔内に投与し、生存率およびマウスの状態を観察した。対照
群には D H M E Q を含まない 0.5% CMC 液を同様に 1 ヶ月にわた
り週 3 回腹腔内に投与した。その結果を図 3 3 に示す。なお、生

存曲線は Kaplan-Meier (Kaplan and Myer)法により計算し、
統計学的有意差は Cox-Mantel テストにて判定した。図 3 3 に示
されるように、D H M E Q 4mg/kg 投与群(D H M E Q (+))は
実験開始後、約 200 日で 6 匹中 4 匹が生存し、これに対し、対照
群(D H M E Q (-))は 5 匹全例が死亡し、統計学的に有意差を
得た(Cox-Mantel テスト; $p < 0.05$)。また、D H M E Q 12mg/kg
投与群(D H M E Q (+))は実験開始後約 30 日で 6 匹中 5 匹生
存したが、これに対し非投与群(D H M E Q (-))は 5 匹中 4 匹
が死亡し、統計学的に有意差を得た(Cox-Mantel テスト; $p < 0.05$)。

なお、投与群(D H M E Q (+))はマウスの体重等に異常は認め

65

ず、DHMEQ 4mg/kg の3倍量を用いても毒性は認めなかった。この結果、DHMEQ は *in vivo* において移植 ATL 細胞によるマウス個体の死亡を救う (rescue) ことができることが明らかとなった。

6 <実施例 2 2>

DHMEQ と放射線照射とを併用した場合の相乗効果

DHMEQ の *in vivo* ヒト肺癌に対する腫瘍細胞の増殖抑制効果について調べた。2×10⁶ のヒト肺癌細胞株 PK-2 を SCID マウス (7匹) の右背部皮下に接種し、DHMEQ 12mg/kg を1日置きに1回 200μl で5日間腹腔内注射 (i.p.) した。その後、7日ごとに腫瘍の長径と短径を測定し、(長径)×(短径)²×0.5 により腫瘍体積を算出した。その結果を図34に示す。図34に示されるように、DHMEQ を用いると腫瘍細胞の増殖が有意に抑制されることが明らかとなった。

15 次に、放射線照射した腫瘍細胞における DHMEQ の آپトーシス増強効果について調べた。DHMEQ 10μg/ml を6時間投与したヒト肺癌細胞株 Colo357 と、20Gy の放射線を照射して6時間インキュベーションしたヒト肺癌細胞株 Colo357 と、20Gy の放射線を照射した直後から DHMEQ 10μg/ml を6時間投与したヒト肺癌細胞株 Colo357 を、それぞれアネキシン (Annexin)-V とPI (プロピジウムイオダイド) で二重染色し、フローサイトメトリでアポトーシス初期段階にある細胞 (右下) を測定し、その比率を算出した。その結果を図35に示す。図35に示されるように、DHMEQ 単独ではヒト肺癌細胞株 Colo357 においてアポトーシスは誘導されなかった。これに対して、20Gy の放射線照射した後、DHMEQ を投与した細胞では、20Gy の放射線照射のみを行った細胞に比べ、アポトーシスの誘導能が約3倍増強することが明らかとなった。

また、DHMEQ の放射線併用におけるヒト肺癌細胞株に対す

66

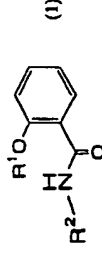
る *in vitro* 増殖抑制効果について調べた。5×10⁵ のヒト肺癌細胞株 Panc-1、PK-8、Colo357 を 10cm dish にまき、2日後に 2.5Gy 若しくは 10Gy で放射線照射を行い、続いて併用群では 10μg/ml の DHMEQ を4時間投与し、24時間後に細胞数を計測した。なお、放射線照射終了後若しくは薬剤添加時を0時間とした。その結果を図36に示す。これにより、DHMEQ は4時間の薬剤接触のみで、ヒト肺癌細胞株 PK-8、Colo357 に対し十分な増殖抑制効果を有し、その効果は 2.5Gy 相当の放射線照射に匹敵した。放射線抵抗性でかつ DHMEQ 単独の効果が乏しい Panc-1 においては、放射線照射と DHMEQ との併用でその治療抵抗性が消失した。Colo357 と Panc-1 では、放射線照射との併用で DHMEQ は相乗的な増殖抑制効果を示し、2.5Gy の照射効果を4倍の 10Gy 相当まで増強することが明らかとなった。

15 産業上の利用の可能性

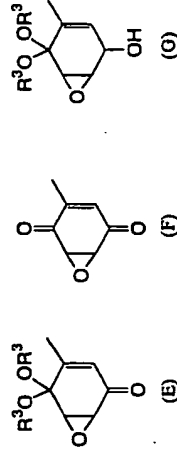
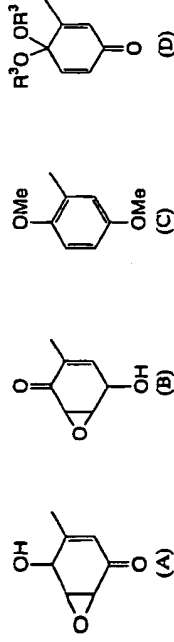
本発明によって、NF-κB の活性化を伴う症状を改善することができる医薬組成物を提供することができる。

請求の範囲

1. 腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善するための
 の下記的一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容
 される塩を有効成分として含有する医薬組成物。



- (式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、
 R²は、下記の式(A)から(C)のいずれかで表される基である。)



- (式中、R³はC1～4のアルキル基である。)
2. 前記腫瘍細胞のアポトーシスによって、少なくとも1つの
 症状を改善することを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。
3. 前記腫瘍細胞のアポトーシスが寄与しないで、前記腫瘍細胞に
 起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする
 請求項1に記載の医薬組成物。

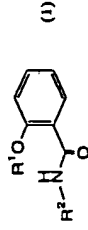
4. NF-κBの活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する
 少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項3に記載の
 医薬組成物。
5. 前記症状が、腫瘍転移であることを特徴とする請求項3に
 記載の医薬組成物。
6. 血管内皮細胞との接着を阻害することにより、腫瘍転移を
 改善することを特徴とする請求項5に記載の医薬組成物。
7. 前記腫瘍細胞の増殖を阻害することにより、前記腫瘍細胞
 に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする
 請求項1に記載の医薬組成物。
8. 前記症状が、ホジキン病、癌悪液質、白血病からなるグループ
 から選ばれたる症状であることを特徴とする請求項1に記載
 の医薬組成物。
9. 前記腫瘍細胞が、乳癌細胞であることを特徴とする請求項
 3に記載の医薬組成物。
10. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴
 とする請求項1に記載の医薬組成物。



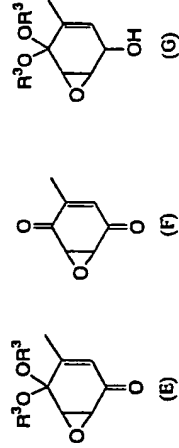
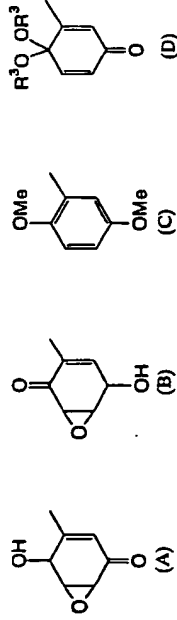
11. 前記癌悪液質の症状である、体重減少、ヘマトクリット
 値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一
 つの症状を予防または改善することを特徴とする請求項8に記載
 の医薬組成物。
12. 前記腫瘍細胞が形成する腫瘍内の血管新生を阻害するこ
 とにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善

することを特徴とする請求項 3 に記載の医薬組成物。

- 1 3. NF- κ B を活性化させる治療による NF- κ B の前記活性化を阻害することにより、前記治療の効果を増大させることができ、下記の一般式 (1) で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。



- (式中、R¹ は水素原子または C 2 ～ 4 のアルカノイル基であり、R² は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。)



(式中、R³ は C 1 ～ 4 のアルキル基である。)

- 1 4. 前記 NF- κ B を活性化させる治療が、抗腫瘍剤を用いた治療であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の医薬組成物。
- 1 5. 前記 NF- κ B を活性化させる治療が、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

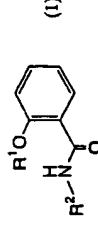
- 1 6. 前記抗腫瘍剤を有効成分として含有することを特徴とする請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

- 1 7. 前記抗腫瘍剤は、カンプトテシン、またはダウノルビシンであることを特徴とする請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

- 1 8. 前記化合物が下記の式 (1a) または (1b) であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

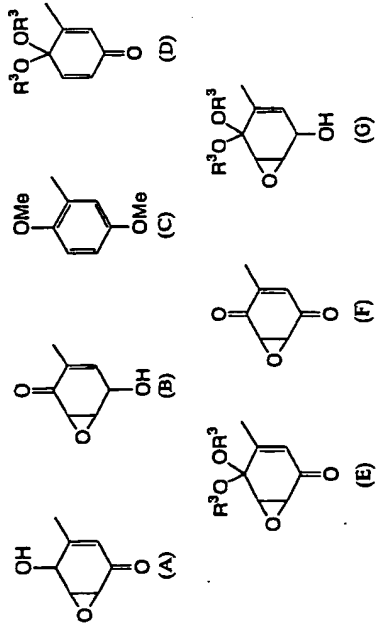


- 1 9. 下記の一般式 (1) で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、腫瘍細胞の増殖を阻害するための腫瘍細胞増殖阻害剤。



- (式中、R¹ は水素原子または C 2 ～ 4 のアルカノイル基であり、R² は、下記の式 (A) から (G) のいずれかで表される基である。)

71



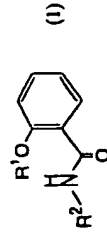
(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

20. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項19に記載の腫瘍細胞増殖阻害剤。



6

21. 下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、血管内皮細胞の接着分子の発現を抑制するための接着分子発現抑制剤。

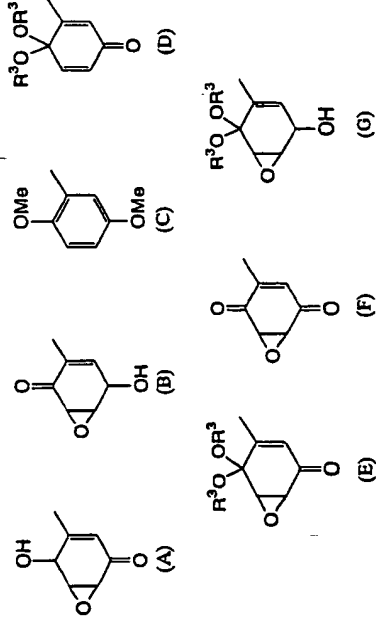


(式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、

10

72

R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

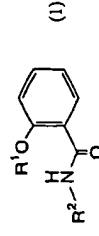


(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

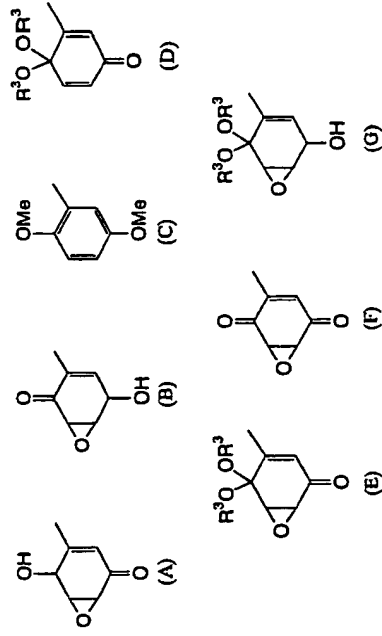
22. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項21に記載の血管内皮細胞由来の接着分子発現抑制剤。



23. 下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するためのアポトーシス誘導剤。



(式中、R¹は水素原子またはC 2～4のアルカノイル基であり、R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



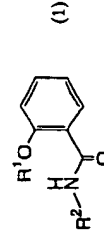
(式中、R³はC 1～4のアルキル基である。)

2 4. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項 2 3 に記載のアポトシス誘導剤。

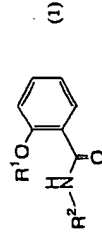


2 5. NF-κB 阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する動脈硬化の予防・治療剤。

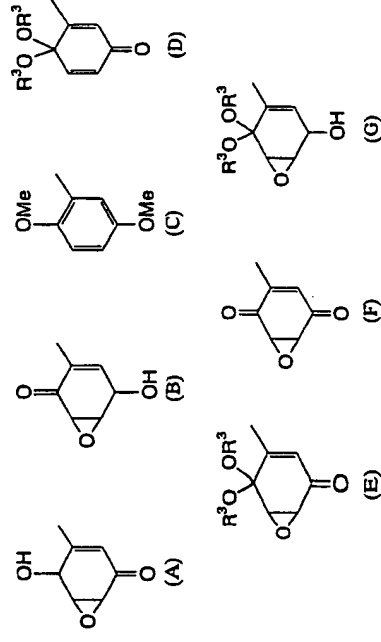
2 6. NF-κB 阻害作用を有する化合物が下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 2 5 に記載の予防・治療剤。



(式中、R¹は水素原子またはC 2～4のアルカノイル基であり、



(式中、R¹は水素原子またはC 2～4のアルカノイル基であり、R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



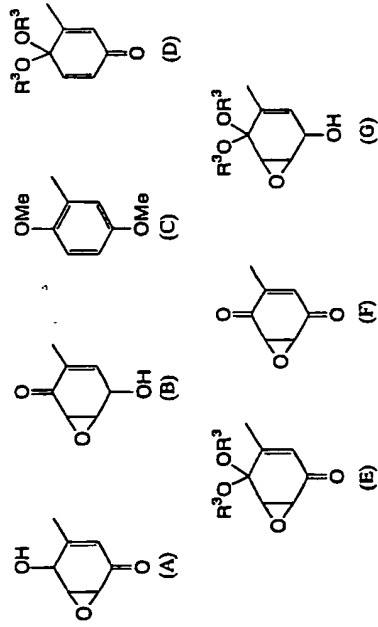
(式中、R³はC 1～4のアルキル基である。)

2 7. NF-κB 阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する癌の予防・治療剤。

2 8. NF-κB 阻害作用を有する化合物が下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 2 7 に記載の予防・治療剤。

75

R³は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

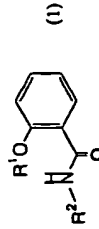


(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

29. 癌の転移抑制のために用いられる請求項27に記載の予

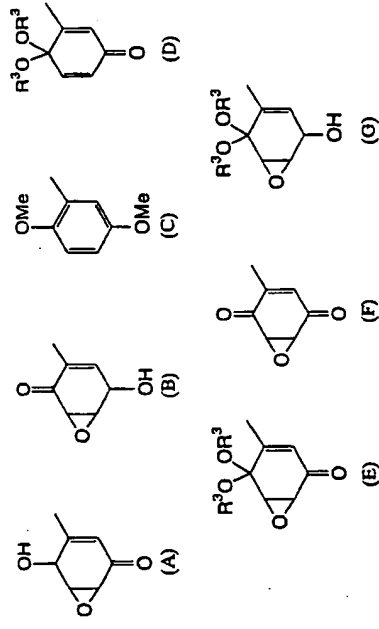
6 防・治療剤。

30. 下記の一様式(1)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する悪疫質治療剤。



(式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

76



(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

31. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項30に記載の悪疫質治療剤。



5

32. 腫瘍患者における悪疫質の治療剤であることを特徴とする請求項30に記載の悪疫質治療剤。

33. 腫瘍患者における悪疫質の症状である、体重減少、ヘマトクリット値の減少、脂肪の減少、および筋肉の減少のうち、少なくとも一つ一つの症状を予防または改善することを特徴とする請求項30に記載の悪疫質治療剤。

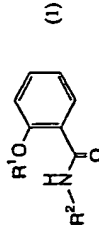
34. NF-κB阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する悪疫質治療剤。

35. 腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善するた

10

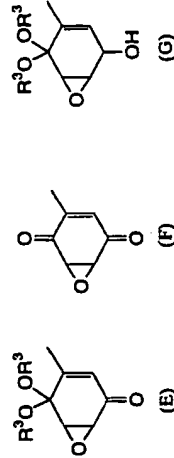
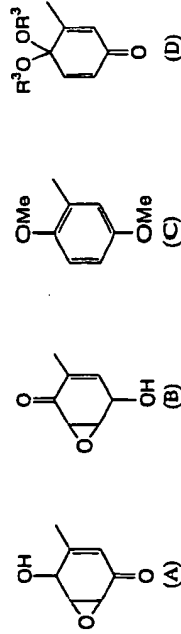
77

めの下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を用いることを特徴とする治療方法。



5

(式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、R²は、下記の様式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

36. 前記腫瘍細胞のアポトーシスによって、少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項35に記載の治療方法。

37. 前記腫瘍細胞のアポトーシスが希与しないで、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請求項35に記載の治療方法。

38. NF-κBの活性化を阻害することにより、前記腫瘍細胞に起因する少なくとも1つの症状を改善することを特徴とする請

78

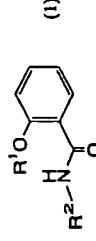
求項35に記載の治療方法。

39. 前記症状が、腫瘍転移、前記腫瘍細胞の増殖から生じる症状、ホジキン病、癌悪液質からなるグループから選ばれる症状であることを特徴とする請求項35に記載の治療方法。

40. 前記化合物が下記の様式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項35に記載の治療方法。

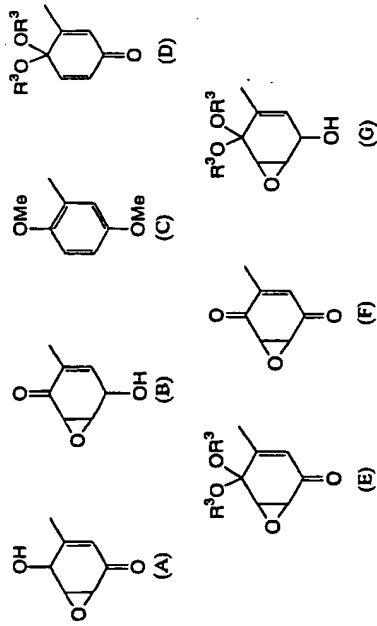


41. 血管内皮細胞と白血球との接着を阻害することにより、動脈硬化を改善するための下記の様式(1)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を用いることを特徴とする治療方法。



16 (式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、R²は、下記の様式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)

79

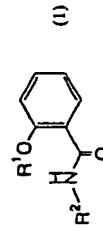


(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

42. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項41に記載の治療方法。



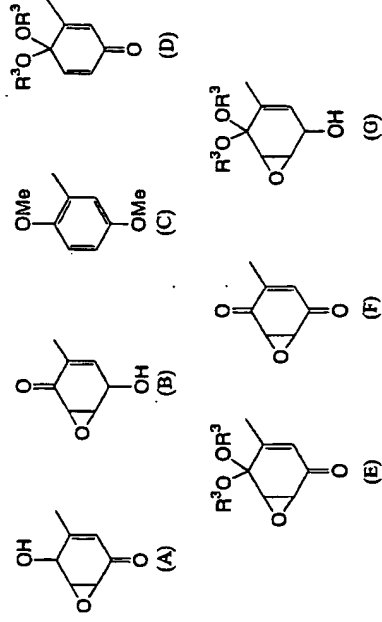
43. NF-κBを活性化させる治療を行うステップと、下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物を投与するステップとを含むことを特徴とする治療方法。



10

80

(式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、R²は、下記の式(A)から(G)のいずれかで表される基である。)



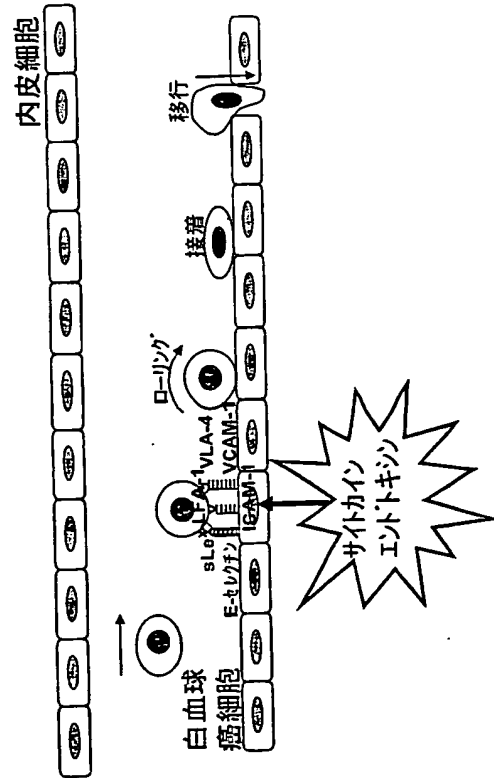
(式中、R³はC1～4のアルキル基である。)

44. 前記 NF-κB を活性化させる治療が、抗癌剤の投与であることを特徴とする請求項43に記載の治療方法。

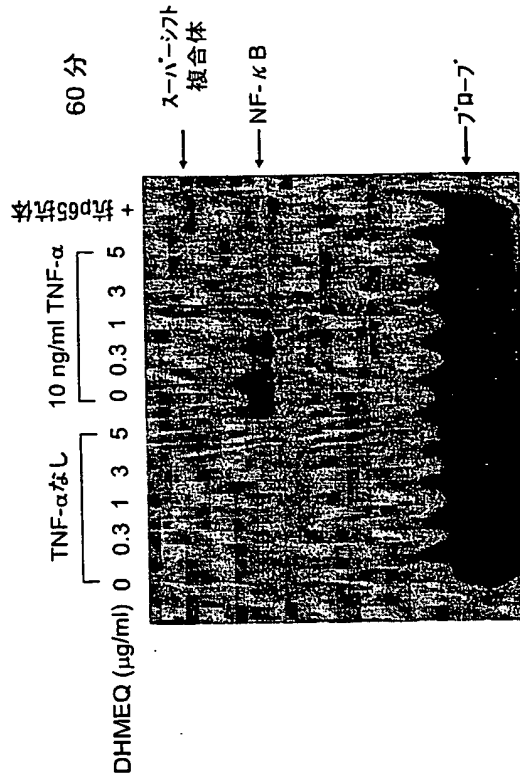
45. 前記 NF-κB を活性化させる治療が、腫瘍細胞に対する放射線照射による治療であることを特徴とする請求項43に記載の治療方法。

46. 前記化合物が下記の式(1a)または(1b)であることを特徴とする請求項43に記載の治療方法。





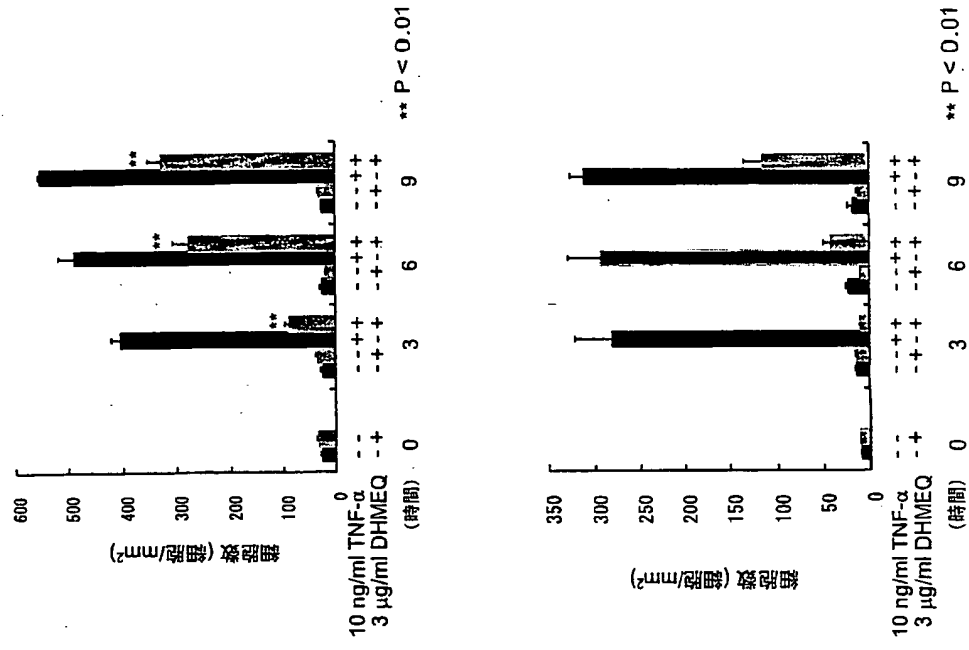
第 1 図



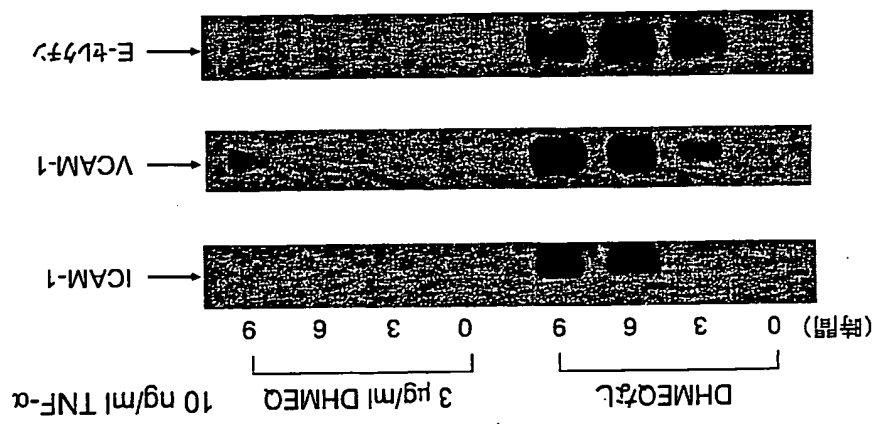
第 2 図

4/33

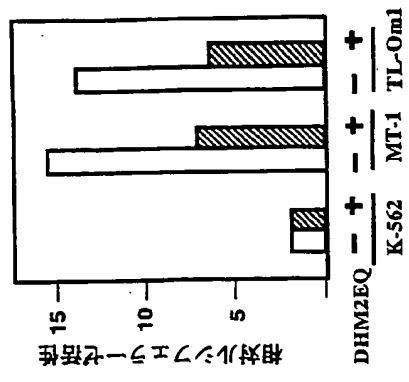
3/33



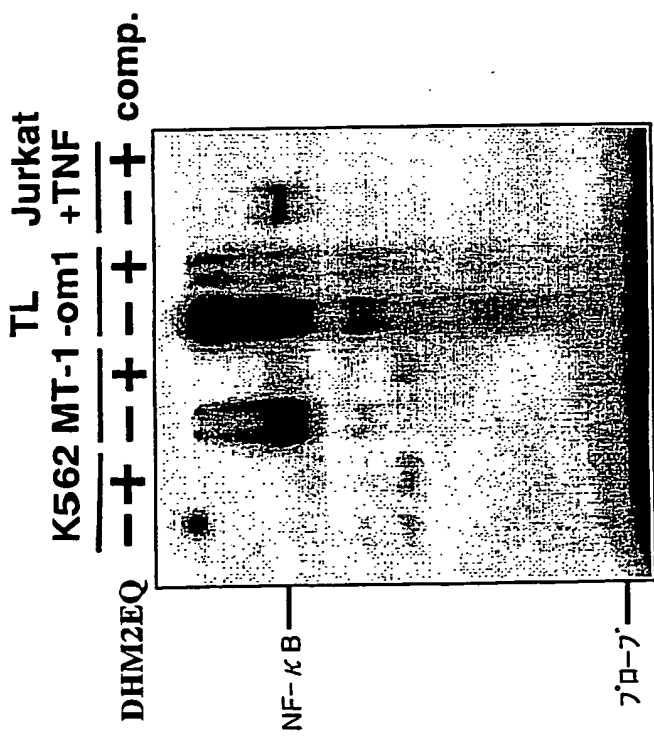
第 4 図



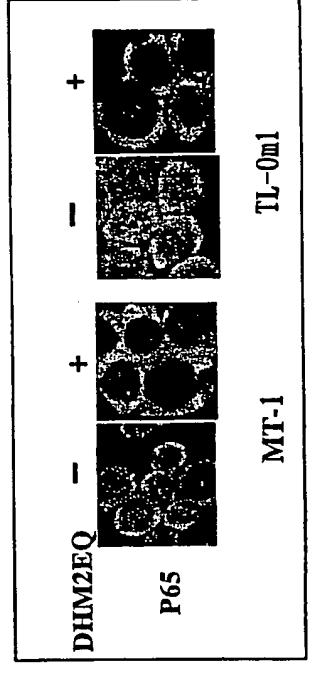
第 3 図



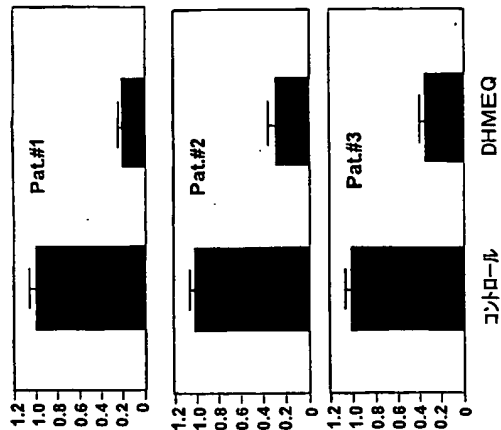
第 6 図



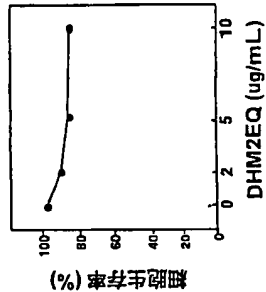
第 5 図



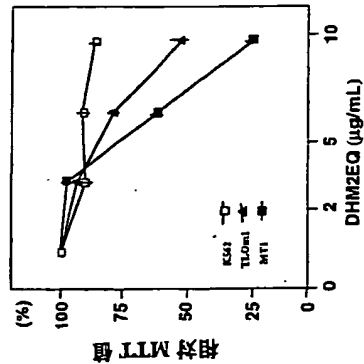
第 7 図



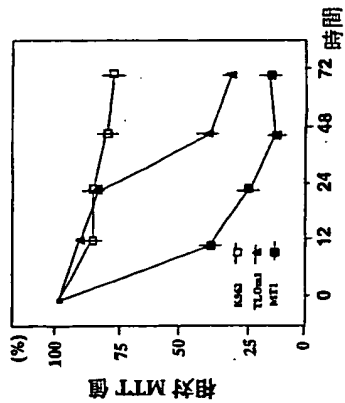
第 10 図



第 11 図

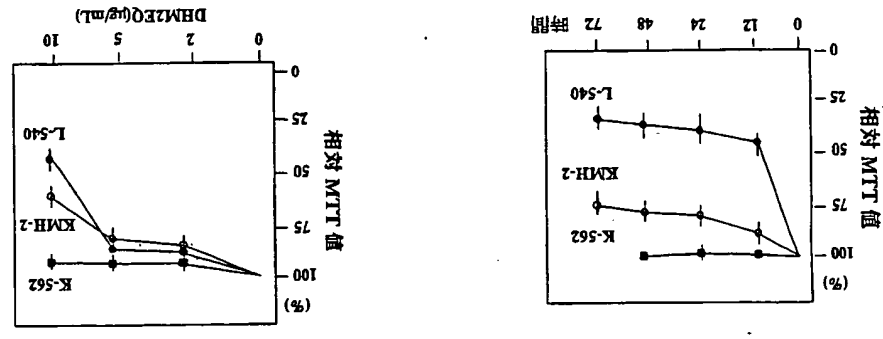


第 8 図

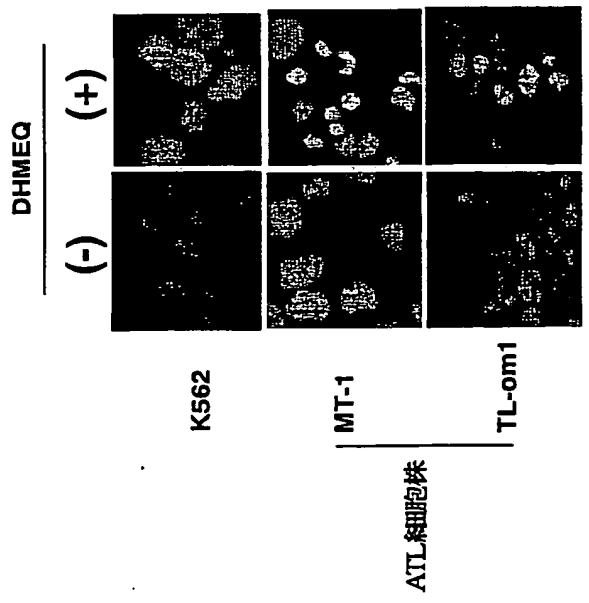


第 9 図

(1) ホジキン細胞株に対する増殖抑制効果一経時的解析
(2) ホジキン細胞に対する増殖抑制効果一濃度依存性

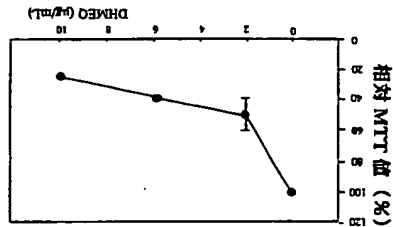


第 13 図

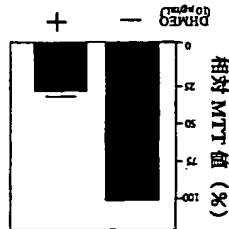


第 12 図

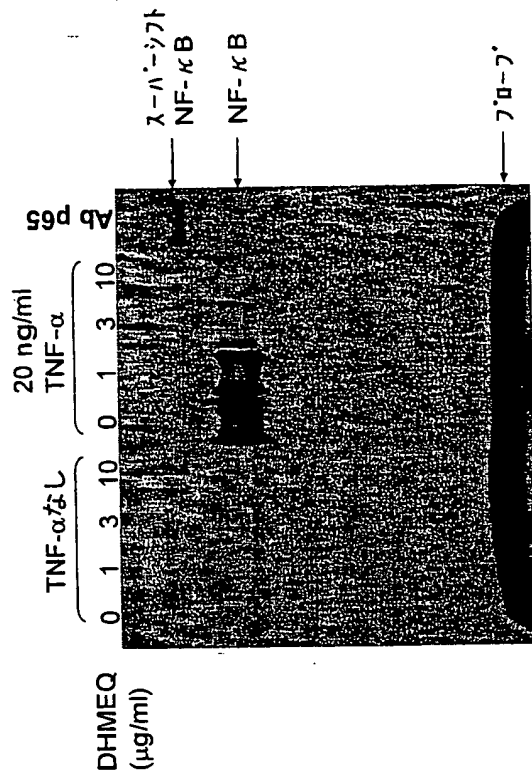
② 増殖抑制効果の濃度依存性



① 増殖抑制効果

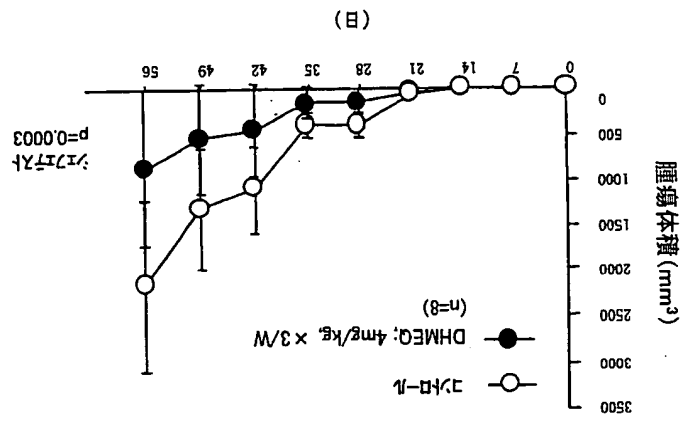


第 14 図



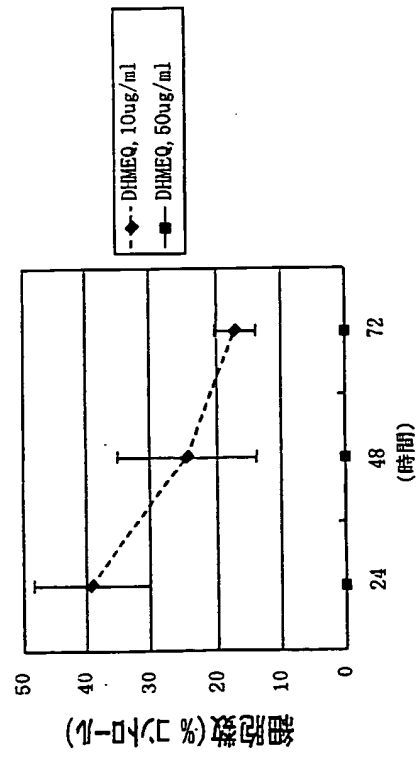
第 15 図

1 4 / 3 3



第 1 7 図

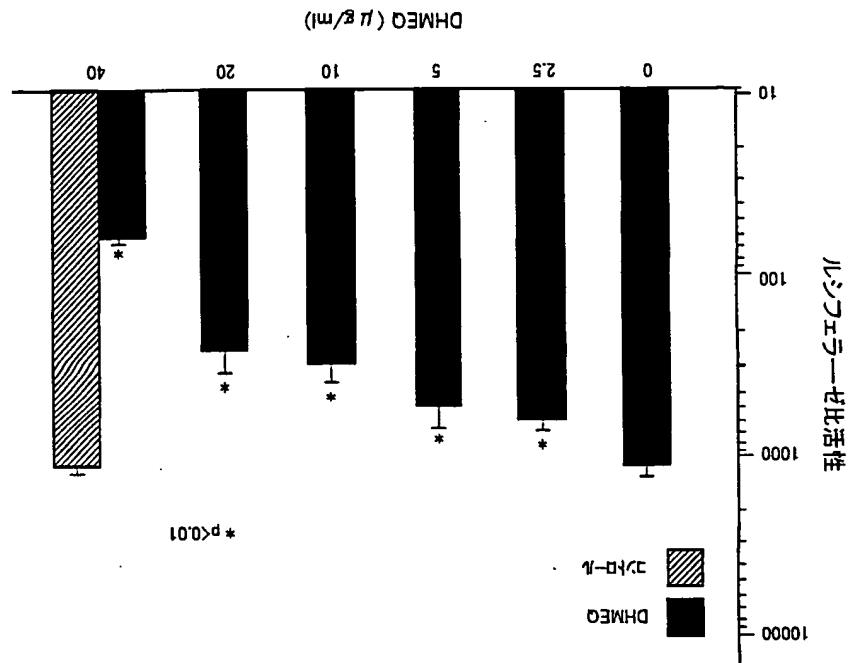
1 3 / 3 3



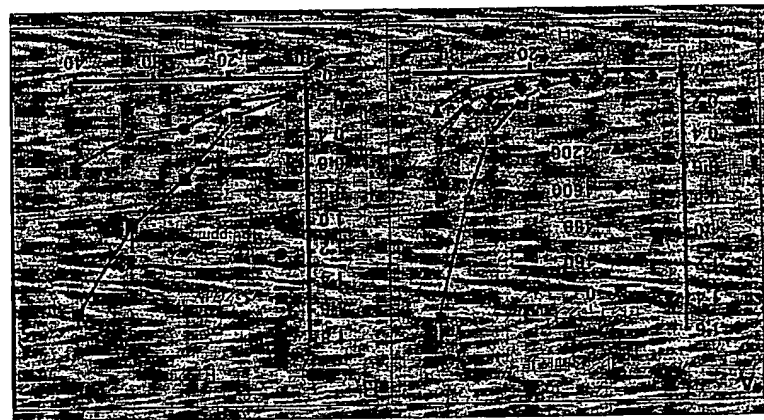
第 1 6 図

16/33

15/33



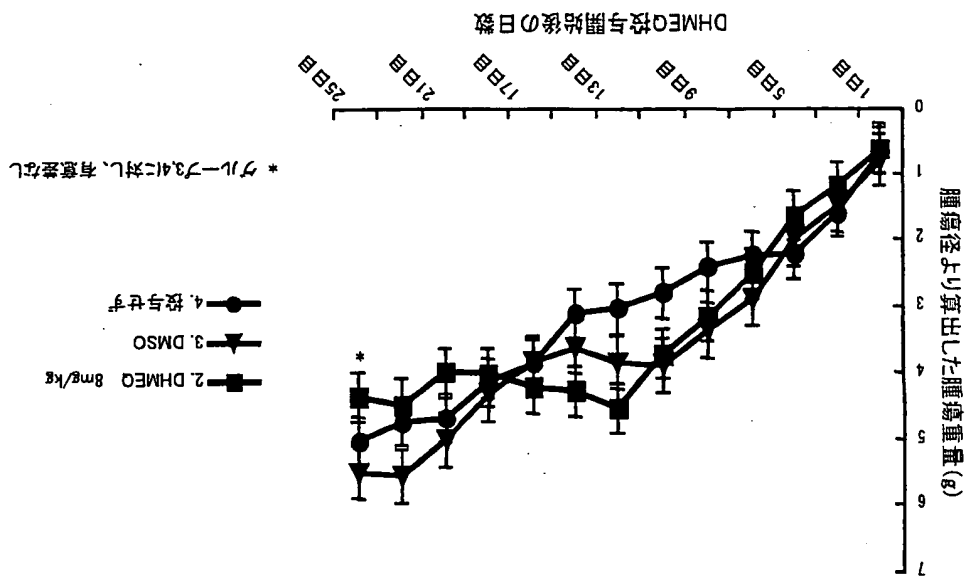
第 19 図



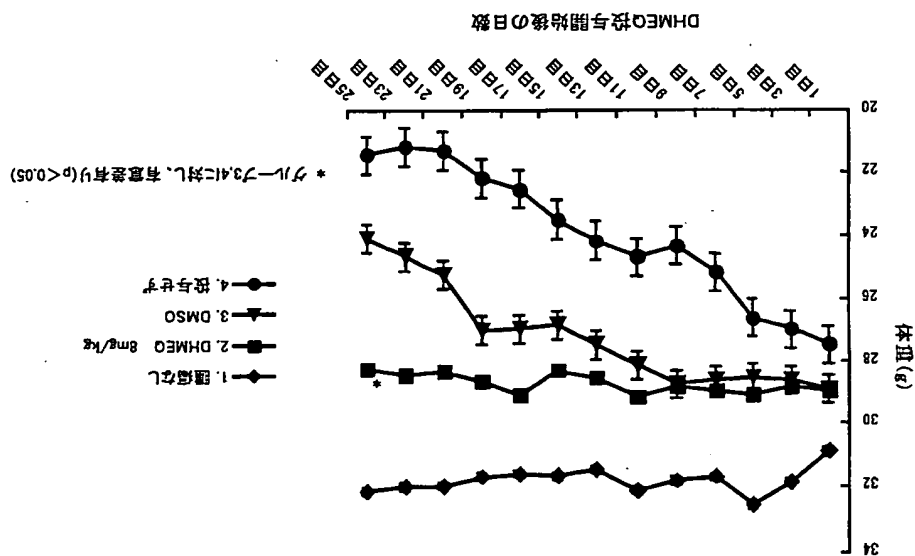
第 18 図

18/33

17/33



第 21 図



第 20 図

20/33

19/33

* ヴル-3.4に対し、有意差あり(p<0.05)

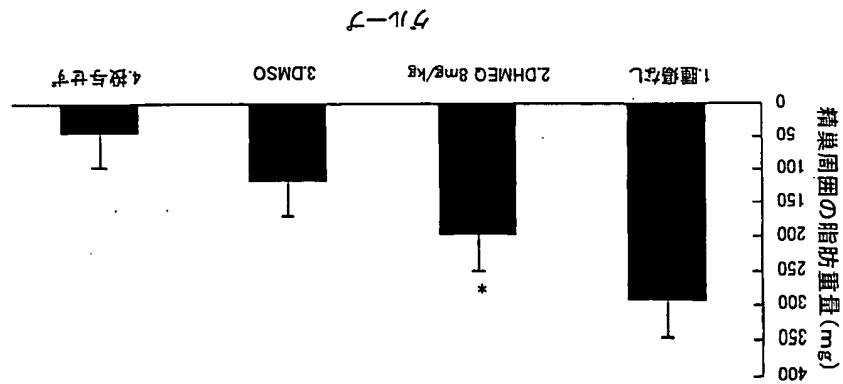


図 23

* ヴル-3.4に対し、有意差なし

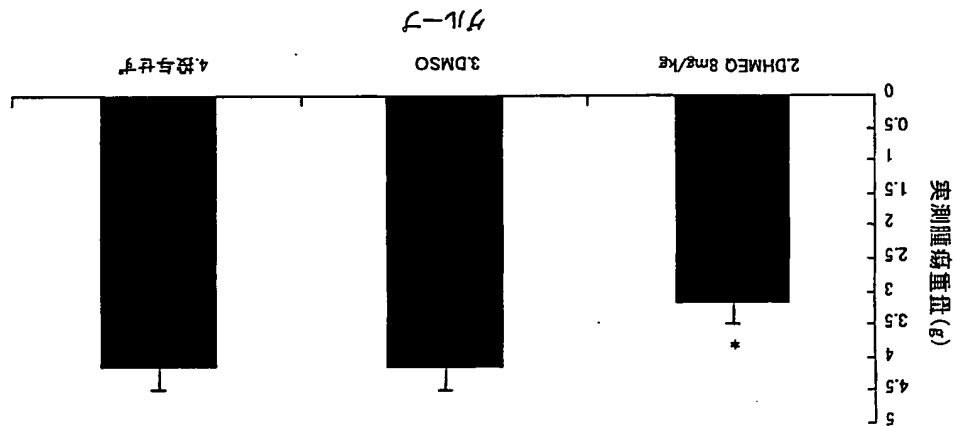


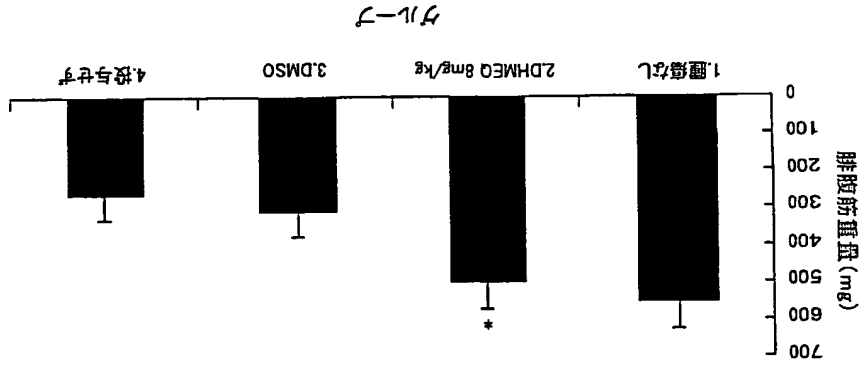
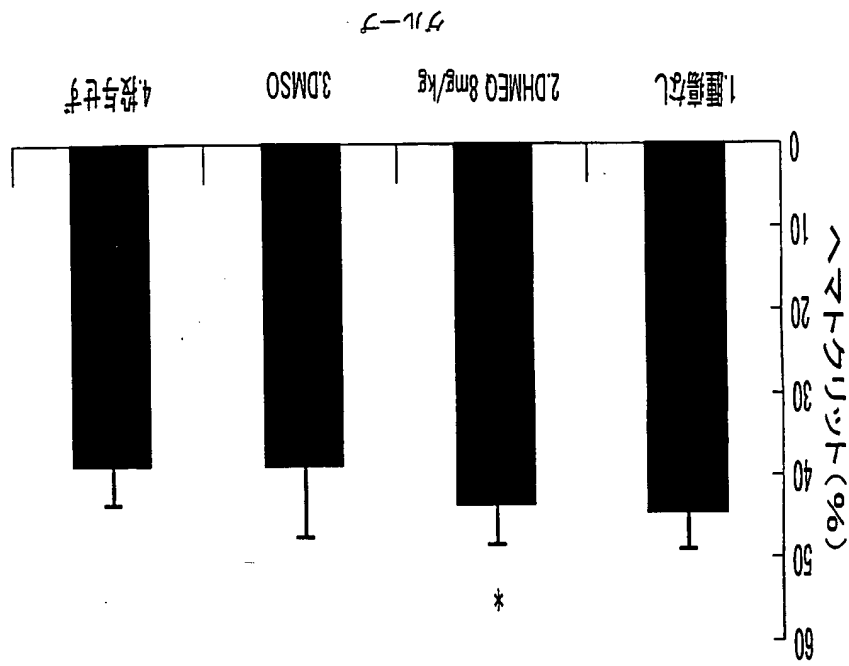
図 22

22/33

21/33

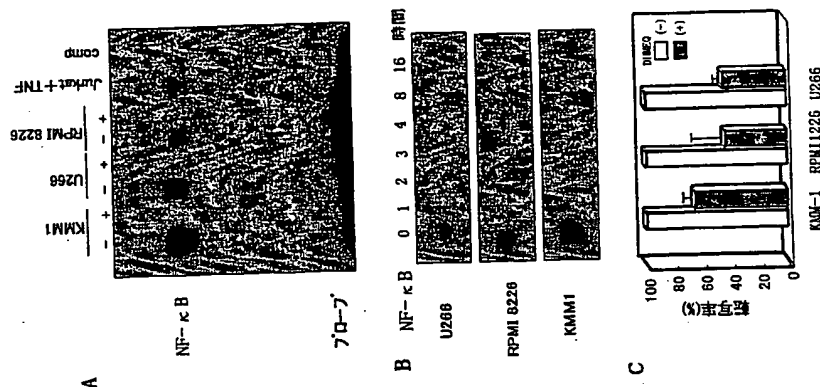
* ユーザー3.4に對し、有意差あり(p<0.05)

* ユーザー3.4に對し、有意差あり(p<0.05)



24/33

29/33



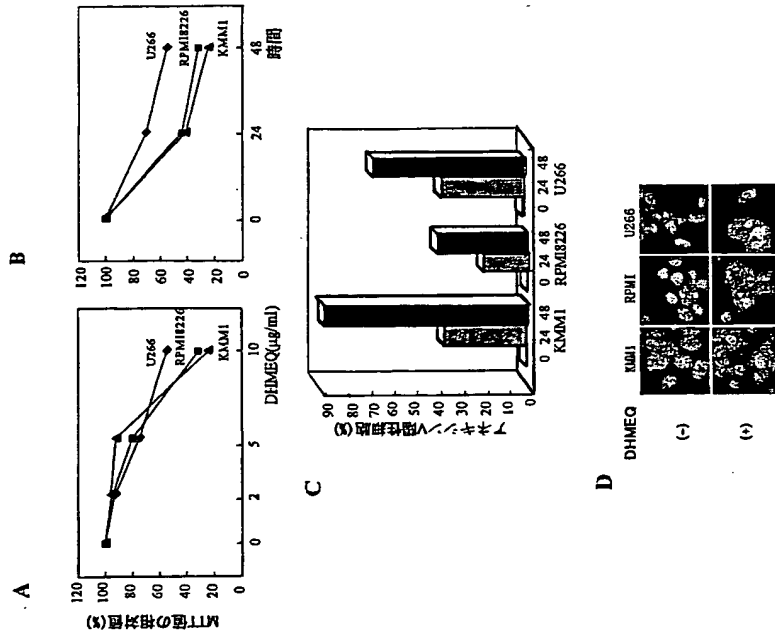
第 27 図

| 肝臓 (mg) | 脾臓 (mg) | 腎臓 (mg) | 精巣 (mg) | 肺 (mg) | 心臓 (mg) | 重量 (g) |
|------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------|
| 1889.9 ± 44.1 | 109.2 ± 8.4 | 562.9 ± 16.8 | 212.4 ± 9.0 | 204.6 ± 7.7 | 163.3 ± 4.5 | *3.2 ± 0.8 |
| *1709.5 ± 81.3 | *275.9 ± 22.2 | *480.3 ± 22.5 | *203.2 ± 9.2 | *204.6 ± 13.8 | *144.7 ± 4.3 | 4.2 ± 0.8 |
| DMSO i.p. | 354.2 ± 40.9 | 423.7 ± 20.1 | 153.0 ± 9.7 | 189.5 ± 10.8 | 127.9 ± 4.0 | 4.1 ± 1.1 |
| 投与せず | 241.2 ± 35.1 | 338.1 ± 9.3 | 127.8 ± 5.9 | 156.8 ± 2.9 | 114.4 ± 2.3 | 0.0034 |
| *リル-73に 対する効果 | 0.9362 | 0.9818 | < 0.0001 | 0.3050 | 0.0034 | 0.3511 |
| *リル-74に 対する効果 | 0.0222 | 0.0691 | 0.0230 | < 0.0001 | 0.0058 | 0.4027 |

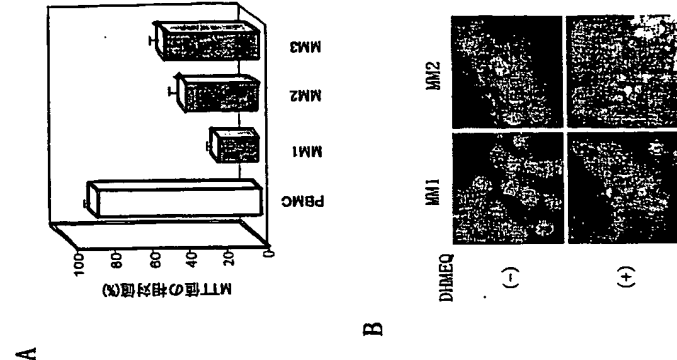
リル-71 リル-72 リル-73 リル-74

第 26 図

25 / 33



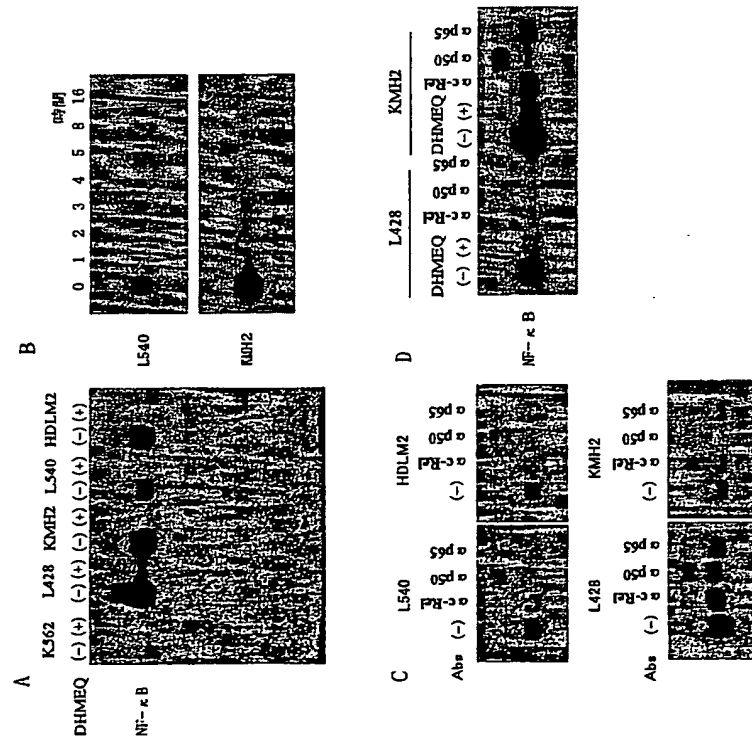
第 28 図



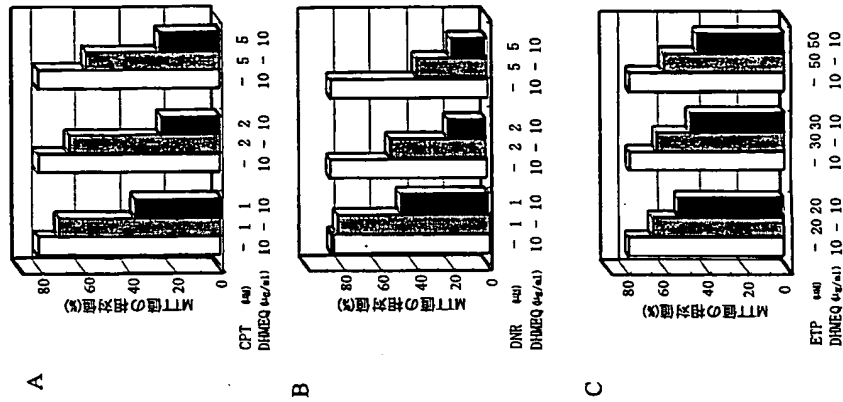
第 29 図

27/33

28/33



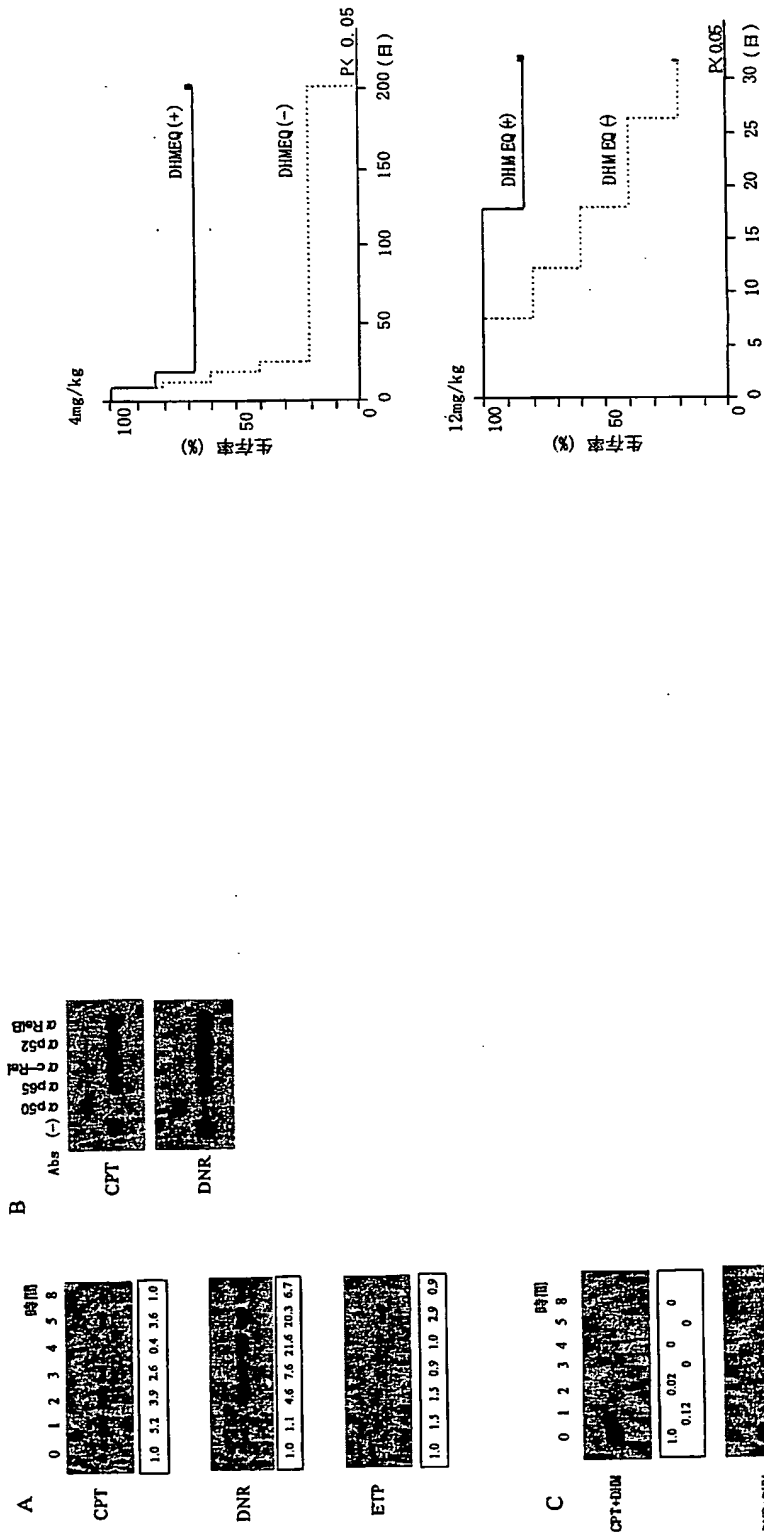
第 30 図



第 31 図

30/33

29/33



第 33 図

第 32 図

32/33

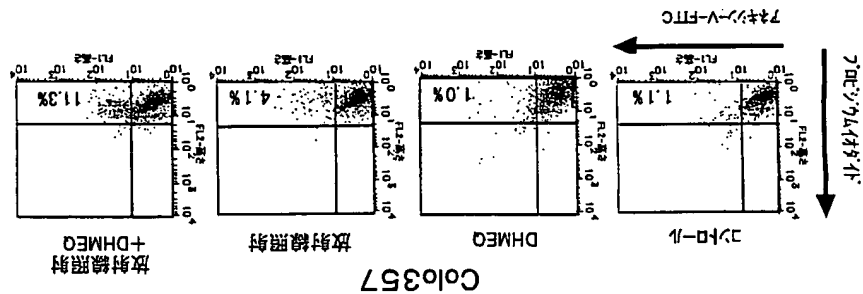


図 35

31/33

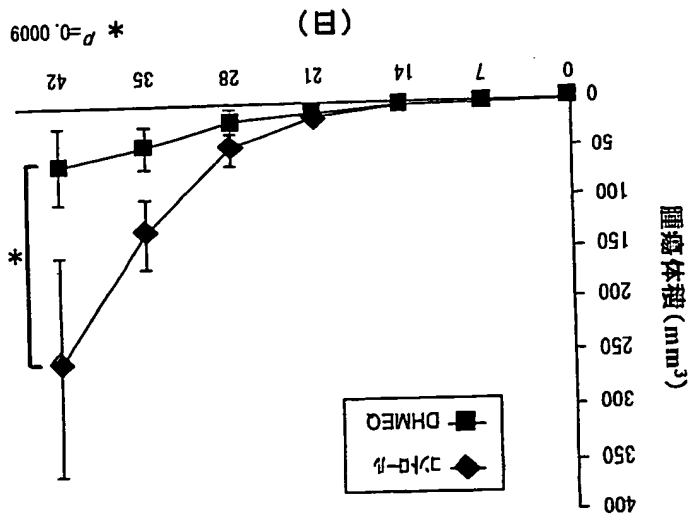


図 34

33 / 33

SEQUENCE LISTING

- <110> KEIO UNIVERSITY
- <120> Pharmaceutical composition comprising NF-kappaB inhibitor
- <130> PCT/628
- <150> JP 02/185866
- <151> 2002-06-26
- <150> JP 03/37167
- <151> 2003-02-14
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Inventor: Umezawa Kazuo
Inventor: Kawai Yohko
Inventor: Horie Ryouichi
Inventor: Toshiki Watanabe
Inventor: Toi Masakazu

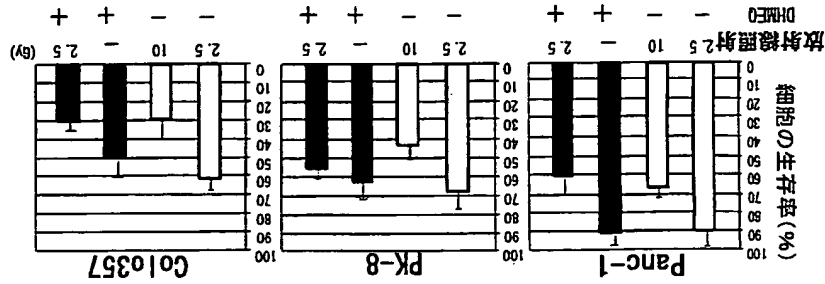


図 36 第

Inventor: Matsumoto Gaku
Inventor: Horiguchi Yutaka
Inventor: Nakajima Jun

22

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

agttgagggg actttccceg gc

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

tcaactccc tgaaggatc cg

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/08134

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ¹ A61K31/167, 45/00, 31/336, A61P9/10 101, 35/00, 35/04, 43/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ¹ A61K31/167, 45/00, 31/336, A61P9/10 101, 35/00, 35/04, 43/00 | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), CROLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN) | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. |
| X | Kazuo UMEZAWA, "Tensha Inshi NF-kB no Yakuwari to Sogai zai", Surgery Frontier, 01 June, 2002 (01.06.02), Vol.9, No.2, pages 88 to 91 |
| Y | WO 01/12580 A1 (MERCAN CORP.), 22 February, 2001 (22.02.01), & EP 1219596 A1 & AU 2000064727 A & US 6566394 B1 |
| Y | MATSUMOTO, N., "Synthesis of NF-kB activation inhibitors derived from epoxiquinomicin C", Bioorg Med. Chem. Lett., (2000), Vol.10, No.9, pages 865 to 869 |
| Y | ASEA A., "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TIR4.", J. Biol. Chem., 26 April, 2002 (26.04.02), Vol.277, No.17, pages 15028 to 15034 |
| Y | YAN Z., "Benzolalpyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 18 February, 2000 (18.02.00), Vol.275, No.7, pages 4949 to 4955 |
| Y | Keiichi IISHIKAWA, "NF-kappa B as a therapeutic drug target.", Folia Pharmacologica Japonica, (2001), Vol.118, No.3, pages 197 to 202 |
| P, X | WO 02/049632 A1 (Institute of Medicinal Molecular Design Inc.), 27 June, 2002 (27.06.02), & AU 2002022683 A |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/08134

| | |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. |
| Y | ASEA A., "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TIR4.", J. Biol. Chem., 26 April, 2002 (26.04.02), Vol.277, No.17, pages 15028 to 15034 |
| Y | YAN Z., "Benzolalpyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 18 February, 2000 (18.02.00), Vol.275, No.7, pages 4949 to 4955 |
| Y | Keiichi IISHIKAWA, "NF-kappa B as a therapeutic drug target.", Folia Pharmacologica Japonica, (2001), Vol.118, No.3, pages 197 to 202 |
| P, X | WO 02/049632 A1 (Institute of Medicinal Molecular Design Inc.), 27 June, 2002 (27.06.02), & AU 2002022683 A |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/08134

- Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
- This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
- ☒ **Claims Nos.: 35-46**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 35-46 pertain to methods for treatment of a human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and Rule 39.1 (iv).
 - ☒ **Claims Nos.: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 34**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet)
 - ☐ **Claims Nos.:**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-24 and 27-34 relate to a drug composition for cancer treatment comprising a compound having NF-κB inhibiting activity as an active ingredient, while claims 25 and 26 relate to a drug composition for arteriosclerosis treatment comprising a compound having NF-κB inhibiting activity as an active ingredient.

The matter common to claims 1-34 is a drug composition comprising a compound having NF-κB inhibiting activity as an active ingredient. However, this is disclosed in references (see WO 01/12588 A1, WO 99/65449 A1, etc.) and is thus not novel. Consequently, the drug composition comprising a compound (continued to extra sheet)

- ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/08134

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

having NF-κB inhibiting activity as an active ingredient does not emerge from the state of prior art, and this common matter cannot be recognized as special technical features.

Further, there exists no other matter which is common to all the claims and can be considered as special technical features. Therefore, the number of inventions of this application is 2.

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet(1)

<Subject of search>

Claims 19, 21, 23, 25, 27, 29, 34 relate to a drug composition for arteriosclerosis or tumor treatment comprising a compound defined by desired property "having NF-κB inhibiting activity" as an active ingredient. The compounds of claims 19, 21, 23, 25, 27, 29, 34 comprehend all the compounds having such property. However, only slight proportion of the claimed compounds are disclosed within the meaning of PCT Article 5, and hence it appears that the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacking.

Moreover, with respect to the "compounds having NF-κB inhibiting activity", the scope of compounds having such property cannot be determined even if the technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account. Consequently, the claims 19, 21, 23, 25, 27, 29, 34 also fail to satisfy the requirement of clarity within the meaning of PCT Article 6.

Therefore, the international search has been performed on the drug composition for arteriosclerosis or tumor treatment comprising any of those compounds which have been concretely described in the description with respect to the relationship between "compound having NF-κB inhibiting activity" and arteriosclerosis or tumor and which are identified in claim 1, etc. as an active ingredient.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)

| | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--|
| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JPO8/08134 | |
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | | |
| Int. Cl. A61K31/167, 45/00, 31/336, A61P9/10 101, 35/00, 35/04, 43/00 | | | |
| B. 調査を行った分野 (国際特許分類 (IPC)) | | | |
| 調査を行った微小領域 (国際特許分類 (IPC)) | | | |
| Int. Cl. A61K31/167, 45/00, 31/336, A61P9/10 101, 35/00, 35/04, 43/00 | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | | |
| 国際調査で利用したデータベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN) | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | 関連する請求の範囲の番号 | |
| 引用文献の カテゴリ* | 引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 1-24, 27-34 25, 26 | |
| X | 特許一決, "転写因子NF-κBの役割と阻害剤" Surgery Frontier (2002.06.0 | 1-24, 27-34 | |
| Y | 1) VOL. 9, NO. 2, pp. 88-91 | 25, 26 | |
| Y | WO 01/12588 A1 (DAKJIAN CORPORATION) 2001.02.22 & EP 1219596 A1 & AU 2000064727 A & US 6566394 B1 | 1-34 | |
| Y | WATSUMOTO, N., "Synthesis of NF-κB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C" Bioorg Med Chem Lett., (2000), VOL. 10, NO. 9, pp. 865-869 | 1-34 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C. 図の図にも文献が関連されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する制限を参照。 * 引用文献のカテゴリ 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に関連する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特許な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業界にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 | | | |
| 国際調査を完了した日 | | 国際調査報告の発送日 | |
| 04.08.03 | | 19.08.03 | |
| 国際調査機関の名称及び国 日本特許庁 (ISA/JJP) | | 特許庁審査 (権限のある機関) | |
| 郵便番号100-8916 東京都千代田区有明三丁目4番9号 | | 安藤 倫世 | |
| | | 1P 9837 | |
| | | 電話番号 03-3681-1101 内線 3492 | |

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

| | | | |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--|
| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JPO3/08134 | |
| 関連すると認められる文献 | | | |
| C. (続き) 引用文献の カテゴリ* | 引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求の範囲の番号 | |
| Y | ASEA A., "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70. Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4." J. Biol. Chem., (2002.04.26), Vol. 277, No. 17, pp. 15028-15034 | 1-34 | |
| Y | YAN Z., "Benzol[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (2000.02.18) Vol. 275, No. 7, pp. 4949-4955 | 1-34 | |
| Y | 荒川 慶一, "NF-kappa B as a therapeutic drug target." 日本薬理学会雑誌, (2001), Vol. 118, No. 3, pp. 197-202 | 1-34 | |
| PX | WO 02/049632 A1 (株式会社医薬分子設計研究所) 2002.06.27 & AU 2002022683 A | 1-34 | |

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

第1欄 請求の範囲の一部の図表がでないとき、意見（第1ページの2の続き）
第8条第3項（PCT第17条(3)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 35-46 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

請求の範囲 35-46 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 13, 14, 15, 16, 17, 18 は、有意義な国際調査をすることができ得る程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、特別ページ参照。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(b)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第2欄 発明の非一性が欠如しているとき、意見（第1ページの3の続き）

次に述べるように、この国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-24及び27-34は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分とする癌の治療のための医薬組成物に関するものであり、請求の範囲25及び26は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分とする動脈硬化の治療のための医薬組成物に関するものである。

請求の範囲1-34に共通の事項は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分とする医薬組成物であるが、これは文脈に開示されており（WO 01/12588 A1, WO 99/65449 A1等参照）、所規ではないから、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分とする医薬組成物は先行技術の域を出ず、この共通事項は特異な技術的特徴であるとは認められない。

また、請求の範囲全てに共通の事項であって、特別な技術的効果と考えられる他の共通の事項は存在しないので、本出願に含まれる発明の数は2である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☒ 追加調査手数料を請求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の戻還の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続き（1））（1998年7月）

<調査の対象について>

請求の範囲19, 21, 23, 25, 27, 29, 34は、「NF- κ B阻害作用を有する」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする動脈硬化または腫瘍の治療のための医薬組成物に関するものである。そして、請求の範囲19, 21, 23, 25, 27, 29, 34に係る化合物は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による覆付けを欠くものと認められる。

また、「NF- κ B阻害作用を有する化合物」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲19, 21, 23, 25, 27, 29, 34は、PCT第6条における明細性の要件も欠いている。

よって、調査は、「NF- κ B阻害作用を有する化合物」と動脈硬化または腫瘍との関係についての明細書に具体的に記載された、請求の範囲1等に特定されている化合物を有効成分とする動脈硬化または腫瘍の治療のための医薬組成物について行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.